KOZLOWSKA, A.

CAB INTERNATIONAL
MYCOLOGICAL INSTITUTE
LIBRARY
28 JUL 1992
KOZLOWSKA, A
1956

POLSKA AKADEMIA NAUK
KOMITET NAUK ROLNICZYCH

ROCZNIKI NAUK ROLNICZYCH

ZIEMNIACZANY WIRUS X i WIRUS Y

Metody badawcze

TOM 77

Seria D

Monografie

NSP
RAM
MM

Warszawa 1956
PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO ROLNICZE i LEŚNE

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
8 - OCT 1958

POLSKA AKADEMIA NAUK
KOMITET NAUK ROLNICZYCH

ROCZNIKI NAUK ROLNICZYCH

АННАЛЫ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК
POLISH AGRICULTURAL ANNUAL

TOM 77
Seria D
Monografie

Warszawa 1956
PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO ROLNICZE i LEŚNE

Redaktor techniczny K. Stodolak — Korekta przeprowadzona przez Redakcję

PWRiL. — Zam. 1347. — Nakład 1050 + 60 egz. — Objętość 7,18 ark. wyd., 5,125 ark. druk.
Papier bezdrzewny kl. III, 80 g, 70/100 cm. Druk ukończono w sierpniu 1956.

Grudziądzkie Zakłady Graficzne, Grudziądz. Plac Wolności 5
Zam. 676 — Eg-7-1490

ROCZNIKI NAUK ROLNICZYCH
TOM 77-D 1956

A. KOZŁOWSKA, M. DWURAŹNA, Z. MAJ

ZIEMNIACZANY WIRUS X i WIRUS Y

Metody badawcze

КАРТОФЕЛЬНЫЙ ВИРУС X И ВИРУС Y

THE POTATO VIRUS X AND VIRUS Y. DIAGNOSTIC METHODS

„Dar nie do sprzedaży"
„Cadeau – vente réservée"
„Gift – not for sale"

Warszawa 1956

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO ROLNICZE i LEŚNE

REDAKCJA NACZELNA

Stefan Barbacki, Mieczysław Birecki, Mieczysław Czaja, Czesław Kanafojski, Jan Kielanowski, Anatol Listowski, Jerzy Ostromęcki, Szczepan Pieniążek, Stanisław Sakowicz, Witold Stefański, Heliodor Szwejkowski

Redaktor Naczelny — M. Birecki

ADRES REDAKCJI NACZELNEJ — KOMITET NAUK ROLNICZYCH PAN
Warszawa, Pałac Kultury i Nauki, 27 piętro, pokój 2719

ROCZNIKI NAUK ROLNICZYCH
TOM 77-D 1956

A. Kozłowska

WSTĘP

Problem degeneracji ziemniaka, wysuwający się dziś na jedno z naczelnych zagadnień hodowlanych, mających pierwszorzędne znaczenie dla gospodarki krajowej, wiąże się ściśle z chorobami wywołanymi zakażeniem wirusowym. Opanowany niejednokrotnie w 100% przez kompleksowo występujące wirusy roślinne ziemniak stał się też przedmiotem badań wirusologów roślinnych na całym świecie. Prace te, niejednokrotnie czysto teoretyczne, interesują jednocześnie żywo praktycznych hodowców i uprawowców. Temu też przypisać należy fakt, że wśród setek prac, dotyczących chorób wirusowych ziemniaka, mamy rzadko w innej dziedzinie wiedzy spotykamy tak szeroki wachlarz krańcowo rozmaitego podejścia do zagadnień, rozmaitego sposobu oświetlenia zjawisk, a nade wszystko spotykamy tu ogromną różnorodność stosowanych metod. Choroby wirusowe ziemniaka badane są zarówno przy pomocy metod uprawowo-hodowlanych, jak i próby rozwiązania tych zagadnień wiążą się z największymi osiągnięciami fizyki i biochemii współczesnej, do których należy mikroskop elektronowy, lub stosowanie w badaniach przemian wewnątrzkomórkowych pierwiastków znakowanych tak zwanych izotopów.

Zadaniem pracy niniejszej jest przedstawienie przede wszystkiem metod, służących do wykrywania dwóch najbardziej w Polsce rozpowszechnionych chorób wirusowych ziemniaka: ziemniaczanego wirusa X i smugowatości Y. Praca oparta jest na bogatej literaturze naukowej z tego zakresu, dotyczy jednak w pierwszym rzędzie metod rozpracowywanych w Zakładzie Botaniki W. S. R. i Zakładzie Wirusologii I. H. A. R. od szeregu lat.

Dla całokształtu obrazu zestawiona została na wstępie dotychczasowa nasza wiedza o istocie i właściwościach tych dwóch wirusowych schorzeń. W krótkim ujęciu przedstawione są wyniki osiągnięte dzięki zastosowaniu mikroskopu elektronowego, światła spolaryzowanego, spektrofotometru itd. W sposób natomiast wyczerpujący przedstawione są metody, które mogą być stosunkowo łatwo stosowane w skromnie wyposażonych laboratoriach, a nawet w stacjach hodowlanych. Szklarnia, o ile możności izolowana siatkami przed inwazją mszyc, jest podstawowym warunkiem tego rodzaju obserwacji i badań.

Stosowanie nowych metod poprzedza zawsze okres prób i doświadczeń, dlatego każda na doświadczeniu oparta krytyczna ich ocena, jest ważnym pozytywnym wkładem do ogólnego dorobku. Praca niniejsza jest tego rodzaju próbą. Jeśli ułatwi ona i zachęci do samodzielnych obserwacji i badań tych najbardziej zagadkowych zjawisk, jakimi są choroby wirusowe, to trud w nią włożony będzie nagrodzony.

A. Kozłowska

1. ZIEMNIACZANY WIRUS X

A. SZCZEPY WIRUSA X I ICH ZALEŻNOŚĆ OD WARUNKÓW ZEWNĘTRZNYCH

Ziemniaczany wirus X, nie powodujący często zewnętrznych objawów chorobowych na ziemniakach, jest jednocześnie najszerzej wśród nich rozpowszechniony. Cały szereg uprawianych odmian ziemniaków jest w 100% opanowany przez bezobjawowe szczepy wirusa X (Bawden, Kassanis, Roberts 1948). To rozpowszechnienie wirusa X sprawia, że jest on niemal stałym komponentem kompleksowych wirusowych chorób. Wirus smugowatości Y i liściozwoju E występują bardzo często razem z ziemniaczanym wirusem X.

Pod względem właściwości biologicznych jedną z charakterystycznych cech wirusa X jest jego zmienność. Przeszczepiając sok z licznych odmian ziemniaków na młodociane liście tytoniu, otrzymano całą gamę bardziej lub mniej różniących się między sobą chorobowych objawów. Objawy te zostały po raz pierwszy opisane i zakwalifikowane przez Salamana (1938), jako 6 odrębnych szczepów wirusa X. Należą one do trzech dość dobrze zdefiniowanych grup: 1) szczepy dające na szczepionych liściach tytoniu nekrotyczne plamki z pierścieniowym obrzeżeniem, 2) szczepy dające mozaikę, 3) nie dające żadnych widocznych objawów.

Używając jako roślin testowych prócz tytoniu (odmiana White Burley), równolegle *Nicotiana glutinosa* i *Datura Stramonium* stwierdzono istnienie całego wachlarza, przechodzących w siebie objawów ziemniaczanego wirusa X: od delikatnej, ledwo dającej się zauważyć mozaiki do nekrotycznych pierścieniowo obrzeżonych plam i wyraźnej szyldkretowej struktury na liściach.

Izolując poszczególne fragmenty tkanek liścia i stosując wielkie rozcieńczenie wyciśniętych soków (10^{-5} i 10^{-6}) stwierdzono, że w zarażonej tkance, zarówno ziemniaka jak i tytoniu z reguły występuje nie jeden ale mieszanina szczepów (Salaman 1938). Przewaga jednego z nich decyduje o typie objawów (Bald, White 1942).

Wyizolowany z jednej nekrotycznej plamki liścia tytoniu szczep łagodnej mozaiki, utrzymując się przez szereg pasaży niezmieniony w typie, może jak to wykazały doświadczenia, przejść w szczep silnie wirulentny, powodujący nekrozę (Matthews 1949a). Mutacja odwrotna od ostrego szczepu do łagodnego trudniej przebiega.

Czynnikiem pierwszorzędnego znaczenia, wyzwalającym szczepy wirusa X, są specyficzne właściwości treści komórkowej rośliny gospodarza. Łagodny szczep wirusa X zaszczepiony na *Cyphomandra betacea*, następnie przeszczepiony powtórnie na tytoń, wykazał objawy właściwe szczepowi, powodującemu ostre nekrotyczne objawy (Matthews 1949a).

Powstawanie nowych nie znanych przedtem szczepów wirusa X obserwowano również pod działaniem na zakażone siewki tytoniu par związków takich jak połączenia methyl-bis amonowe „Nitrogen mustard" (Lanson i inni 1954).

Często istnieje analogia między reagowaniem odmian ziemniaków a reagowaniem siewek tytoniu i nade wszystko bielunia *Datura stramonium* na silnie wirulentne szczepy wirusa X. Jednak nie jest to bynajmniej regułą. Licznie przeprowadzone badania nad reagowaniem poszczególnych odmian ziemniaków na szczepy wirusa X, wykazały pod tym względem ogromną różnorodność. (Köhler, Ross 1951, 1953, Bercks 1953). U całego szeregu odmian stwierdzona została nadwrażliwość w stosunku do silnie wirulentnych szczepów wirusa X. Lokalnie zamierająca w miejscu szczepienia pod wpływem białka wirusowego tkanka, uniemożliwia dalsze rozszerzanie się choroby. Odmiany takie są tym samym na wirusa X polowo odporne.

Zmiana warunków zewnętrznych powoduje często zmianę objawów i przechodzenie jednych szczepów wirusa X w drugie.

Szczepy wirusa X, które wywołują w czasie gorących dni lata delikatną mozaikę na młodocianych liściach tytoniu, w zimie mogą dawać objawy nekrotycznych pierścieni (Bawden 1950). Łagodna mozaika wirusa X jest widoczna tylko poniżej 20° C, przy temperaturze wyższej zanika.

Temperatura i światło mają też wpływ bezpośredni na zmiany ilościowe białka wirusowego w żywej tkance. Zakażone szczepem wirusa X, dającym nekrotyczne pierścienie, siewki tytoniu, wystawione na działanie światła o różnej intensywności; 60, 130 i 200 świec, po 8 dniach wykazały różnice w koncentracji wirusowego białka, która wynosiła 1 : 16 : 2. (Matthews 1949). Podniesienie temperatury w warunkach szklarniowych do granicznego punktu 40—50°C powoduje raptowne ilościowe zwiększenie białka wirusowego w tkankach (Kozłowska 1953).

Objawy wirusa X zależą wreszcie w dużym stopniu od wieku rośliny. Młoda komórka reaguje na inwazje wirusowego białka gwałtowniej

niż starsza, ulega też łatwiej zakażeniu. Z wiekiem rośliny ostrość symptomów na ogół maleje.

Wykazane w doświadczeniach laboratoryjnych przechodzenie szczepów silniej i słabiej wirulentnych w siebie znajduje pełne potwierdzenie w obserwacjach polowych. Silnie wirulentne szczepy wirusa X, stwierdzone przy pomocy roślin testowych w jednym roku na ziemniaczanym polu, w latach następnych ustąpiły miejsca łagodnym (C l i n c h 1944). Na odwrót szczepy łagodne mogą przejść w silnie wirulentne.

Ostrość objawów poszczególnych szczepów wirusa X, zarówno na tytoniu jak i na ziemniaku, nie stoi bynajmniej w parze z koncentracją wirusowego białka w żywej tkance. W lecie, gdy w warunkach szklarniowych symptomy na tytoniu są na ogół słabsze, koncentracja białka wirusowego jest wyższa niż w czasie miesięcy zimowych.

Koncentracja białka wirusa X ulega dużym wahaniom zależnie nie tylko od temperatury i światła ale i od okresów rozwojowych rośliny. B e r c k s (1954) badał w warunkach szklarniowych stężenie wirusa X w siewkach tytoniu co 4 dni od momentu zakażenia. Wykazał on, że koncentracja białka wirusowego osiąga w liściach swoje maksimum 18 do 24 dni od chwili zakażenia, po czym gwałtownie spada, utrzymując się do końca wzrostu rośliny na tym samym mniej więcej poziomie. Ponowny wzrost koncentracji wirusa w tytoniach wystąpił bezpośrednio przed zakwitaniem. Po przekwitnieniu ilość białka wirusowego zmniejszyła się wydatnie. Na szeroką skalę prowadzone badania nad chemicznymi czynnikami hamującymi mnożenie się białka wirusowego w roślinnej tkance, tak zwanymi inhibitorami, dotyczą również wszechstronnie poznanego wirusa X. Wypróbowane na wielu innych wirusach roślinnych związki takie jak zieleń malachitowa, tiouracil i inne, podane roślinie w momencie zakażenia, częściowo lub całkowicie hamują rozwój choroby (B a w d e n 1954).

Widoczne w badaniach mikroskopowych zmiany struktury cytoplazmatycznej komórki najłatwiej są dostrzegalne w przypadku łagodnych a nawet bezobjawowych szczepów wirusa X. B a w d e n i S h e f f i e l d (1944) stwierdzili w bezobjawowych ziemniakach, porażonych wirusem X, skupione grudki cytoplazmatyczne większe niż komórkowe jądro. W przypadku silnie wirulentnych szczepów zmiany takie nie są dostrzegalne.

B. ROZSZERZANIE SIĘ WIRUSA X W PRZYRODZIE

Ziemniaczany wirus X nie jest przenoszony przez owady, bardzo łatwo natomiast może być przeniesiony z rośliny na roślinę drogą mechanicznego wprowadzenia zarażonego soku do zranionej tkanki. L o n g h m a n i M u r p h y (1938) stwierdzili przenoszenie się ziemniaczanego wirusa X z rośliny na roślinę w przyrodzie drogą bezpośredniego kontaktu blaszek liściowych. Pogoda wietrzna sprzyja zakażeniom. R o-

berts (1948) w doświadczeniach polowych wykazał jednak, że przenoszenie się wirusa X drogą wzajemnego kontaktu roślin odbywa się bardzo wolno, znacznie słabiej niż zakażenie wirusem smugowatości i liściozwoju, dokonywane przez mszyce. Na 10 roślin zdrowych, stykających się bezpośrednio z roślinami porażonymi wirusem X, zaledwie jedna roślina w czasie okresu wegetacyjnego ulega zakażeniu (Roberts 1946). W przypadku pomidorów, które bardzo łatwo ulegają zakażeniu wirusem X, udało się wykazać, możliwość zakażenia na skutek zetknięcia systemów korzeniowych. Czy u ziemniaków zakażenie wirusem X może się dokonywać poprzez organa podziemne, nie zostało dotychczas w sposób pewny stwierdzone (Bartels 1953). Sprawa rozszerzania się wirusa X w przyrodzie wśród upraw ziemniaczanych jest dotychczas zagadkowa (Roberts 1948). Dodać ponadto należy, że łatwość zakażenia drogą kontaktu organów nadziemnych jest u rozmaitych odmian niejednakowa. Znajdujące się w tych samych zupełnie warunkach odmiany, narażone w jednakowym stopniu na zakażenie, mogą wykazywać do 70% różną podatność na przyjmowanie zarazka (Schulz i inni 1937).

W przeciwieństwie do roślin jednorocznych, rozmnażających się przy pomocy nasion, ziemniak rozmnażany wegetatywnie bulwami, przez następujące po sobie okresy rozwoju, jest stale tą samą rośliną, odnawianą co rocznie tkanką, związaną bezpośrednio z pokoleniem poprzednim. Tym samym treść komórkowa zawierająca wirusowe białko może być przekazywana z roku na rok. W takim stanie rzeczy ważnym jest stwierdzenie, czy porażenie rośliny wirusem X jest równomierne.

Badając metodami serologicznymi, precypitacją i odchyleniem dopełniacza (patrz niżej) poszczególne organa i tkanki wyrośniętej rośliny ziemniaka, porażonej określonym szczepem wirusa X, stwierdzono duże różnice w koncentracji białka wirusowego. W bulwach spod jednego krzaka zachodzą zarówno ilościowe jak i jakościowe różnice w zawartości wirusa X, może on należeć do szczepów o rozmaitym stopniu wirulencji, powodującym różne objawy na tytoniu. W pojedynczej bulwie białko wirusowe mieści się wyłącznie w wiązce sitowo-naczyniowej i w oczkach, natomiast wypełniona materiałem zapasowym tkanka jest białka wirusowego pozbawiona (Prochal 1953). W czasie całego rozwojowego rocznego cyklu, największe nagromadzenie białka wirusowego jest w wyrastających w porze wiosennej kiełkach (Bawden i inni 1948). W tym też okresie wirus X stosunkowo łatwo, w wypadku zetknięcia się wykiełkowanych bulw, może się z bulw porażonych przenosić na bulwy zdrowe (McIntosh 1944).

Rozszerzanie się białka wirusowego od miejsca zakażenia do dalszych organów rośliny, zależne jest od okresu rozwojowego rośliny. Na wiosnę, w pierwszym stadium rozwoju ziemniaka, wirus X z zaka-

żonych liści przedostaje się do pędów i bulw znacznie szybciej, niż w okresach późniejszych, gdy rośliny znajdują się w stadium kwitnienia i owocowania (Boomster 1953).

Różne odmianowe reagowanie ziemniaka na szczepy wirusa X i rozmaita łatwość zakażeń nasuwało przypuszczenie możliwości wyprodukowania odmian przeciw wirusowi X odpornych. Pośrednią polową odporność mają wspomniane wyżej odmiany nadwrażliwe. Odporność rzeczywista była jednak dotychczas stwierdzona na jednym zaledwie rodzie 41 956 U. S. D. A. Istnieje natomiast zjawisko, które niezależnie od odporności, zmniejsza możliwość rozszerzania się szczepów silnie wirulentych wirusa X: jest to interferencja szczepów między sobą. Aczkolwiek istnieje niewątpliwe przechodzenie jednych szczepów wirusa X w drugie, względnie z całego razem występującego kompleksu dochodzenie do głosu coraz to innego z nich, jednak jednocześnie odkryte zostało zjawisko uodporniania roślin szczepem łagodnym przeciw szczepowi zjadliwemu (Salaman 1938). Tego rodzaju antagonistyczne działanie niektórych szczepów między sobą prowadzi do nabytej specyficznej odporności. Zjawisko to znane w zakażeniach zwierzęcych, dla wirusowych chorób roślinnych zostało odkryte po raz pierwszy u wirusa ziemniaczanego X. To antagonistyczne działanie szczepów między sobą jest różne w zależności od rośliny gospodarza. Hutton (1948) wykazał, że 4 łagodne bezobjawowe szczepy wirusa X dają zupełną odporność w stosunku do szczepów silnie wirulentnych na *Datura stramonium*, a nie dają jej natomiast na *D. Metel.*

Nabyta odporność zachodzi jedynie w obrębie blisko siebie stojących szczepów. Nie spokrewnione ze sobą wirusy, występujące razem działają na siebie niekiedy stymulująco, mnożąc się intensywniej. Objawy chorobowe występują wtedy w większym nasileniu. Według Rossa (1950) sok wyciśnięty z tytoniu bądź z ziemniaków porażonych jednocześnie mozaikowymi szczepami wirusa X i Y zawiera więcej białka należącego do wirusa X, niż gdy w tych samych warunkach występuje on samodzielnie. Bercks (1955) natomiast stwierdza, że w wypadku podwójnej infekcji XY, koncentracja wirusa X w porównaniu z kontrolą wzrasta jedynie w młodych roślinach, w pierwszym okresie po zakażeniu. W późniejszych stadiach rozwoju choroby nie ma wyraźnej korelacji między intensywnością chorobowych objawów, a koncentracją zarówno wirusa X jak i Y.

C. NATURA BIAŁKA WIRUSA X, BADANIA POZA ROŚLINĄ „IN VITRO"

Wyizolowanie białka wirusa X z komórkowej treści w możliwie czystym stanie napotyka na duże trudności. Jego obecność w wyciśniętym z tkanki roślinnej soku, w wypadku dużej koncentracji, może być stwierdzona w świetle spolaryzowanym, w którym wirus X oglądany

w prądzie, powodując podwójne załamanie, daje zjawisko świecenia (anisotropy of flow). Odkrycie tego zjawiska (Bawden, Pirie 1938), było dowodem nie tylko krystalicznej budowy wirusa X, ale wskazywało na pałeczkowato — wydłużony kształt jego krystalicznych jednostek. Mimo krystalicznej budowy wyodrębnienie go w stanie czystym z tkanki roślinnej napotyka do dnia dzisiejszego na duże trudności. Białko wirusa X bardzo łatwo przechodzi w stan nierozpuszczalny i adsorbuje na swojej powierzchni inne substancje.

Wirus X, wykazując podobne fizyko-chemiczne własności co główna frakcja białka cytoplazmatycznego (Pirie 1950), wytrącany jest z soku roślinnego tymi samymi metodami co normalne nukleoproteidy, znajdujące się w treści komórkowej.

W wyciśniętym z porażonych liści tytoniu soku, po oddzieleniu wirowaniem chlorofilu i części nierozpuszczalnych, wirus X może być wytrącany bądź klasyczną metodą wysalania siarczanem amonu, bądź zakwaszaniem i doprowadzaniem roztworu do izoelektrycznego punktu, leżącego koło pH = 4, bądź wreszcie wirowaniem przy zastosowaniu ultracentryfugi. Skombinowanie tych metod lub stosowanie ich odrębne, zawsze prowadzi do przechodzenia coraz większej ilości wirusa X w stan nierozpuszczalny. Im procesy związane z czyszczeniem białka wirusowego trwają dłużej tym mniejsza ilość wirusa X przechodzi do roztworu. Jest przy tym znamienny brak prawidłowości pod tym względem. Przy stosowaniu pozornie tych samych metod skutkiem zapewne nieznacznych indywidualnych różnic stosunków fizyko-chemicznych panujących w roztworze, stopień rozpuszczalności wirusa X ulega daleko idącym wahaniom (Bawden, Kleczkowski 1948). Różnice te są ponadto bardzo znaczne zależnie od szczepu wirusa X, rośliny gospodarza, okresu wegetacyjnego itd.

Przeprowadzony w stan nierozpuszczalny wirus X może być wprowadzony z powrotem do roztworu przez krótkotrwałe działanie enzymu proteolitycznego trypsyny. Działanie to musi być jednak krótkie, gdyż wirus X łatwo z drugiej strony pod wpływem trypsyny ulega hydrolizie. Bawden i Crook (1947) ekstrahując wirusa X enzymami proteolitycznymi ze ślimaka, otrzymali dużą stosunkowo jego wydajność.

Właściwość wirusa X przechodzenia *in vitro* w stan nierozpuszczalny znalazła wytłumaczenie w obrazach uzyskanych przy pomocy mikroskopu elektronowego (rys. 1). Takahashi i Rawlins (1946) dla uzyskania możliwie niezmienionego obrazu wirusa X przygotowali materiał do badania w mikroskopie elektronowym w sposób niezmiernie prosty. Liście tytoniu, 19 dni od chwili zakażenia nekrotycznymi i mozaikowymi szczepami wirusa X, z wyraźnymi objawami były dokładnie mielone w młynku elektrycznym (Waring blendor) z dodatkiem wody

destylowanej. Otrzymany miąższ był centryfugowany przez 1/2 godziny przy 3000 obrotów. Odsącz był sączony przez Celitowy sączek 2,5 mm gruby. Następnie wyciąg pochodzący z nekrotycznego szczepu wirusa X

Rys. 1. Wirus X oglądany w mikroskopie elektronowym (x 30000 wg Kanngiessera i Deubnera)

Rys. 2. Agregacja jednostek wirusa X pod wpływem gliceryny (x 30000 wg Kanngiessera i Deubnera)

był rozcieńczany wodą 20-krotnie, a w wypadku szczepu mozaikowego 50-krotnie. W tych rozcieńczeniach podwójne załamanie w prądzie nie było już dostrzegalne. Krople roztworów były następnie suszone na filmie badanym w mikroskopie elektronowym. Uzyskany obraz przedstawiał jednostki wirusa X bardzo odbiegające od dobrze znanych kryształów mozaiki tytoniowej. Były to bardzo delikatne i cienkie powyginane nitki, różniące się bardzo znacznie długością między sobą. Najczęściej mierzyły one od 500—600 mμ długości przy szerokości wynoszącej zaledwie od 15,7 do 16,1 mμ. Jest bardzo interesujące, że chociaż oba badane szczepy powodują na tytoniu różne symptomy, jednak morfologicznie jednostki wirusowe w obu wypadkach okazały się identyczne.

Poddane badaniu w mikroskopie elektronowym nierozpuszczalne osady, wypadające w czasie kolejnych etapów czyszczenia białka wirusowego wykazały zgoła odmienny obraz. Wykrywalne tam duże ilości wirusa X przedstawiały plątaninę długich, nie dających się zmierzyć

nici, tworzących splątaną sieć. Obraz ten jest spowodowany agregacją pałeczek wirusa X ze sobą. Im to liniowe skupienie jednostek wirusa X jest dalej posunięte, tym jego rozpuszczalność jest mniejsza (rys. 2).

Z właściwością agregacji cząstek wirusa X wiąże się jeszcze inna właściwość adsorpcji między cząstkami obcych substancji. Stąd trudność w oddzielaniu wirusa X w pierwszym rzędzie od normalnego białka cytoplazmatycznego. Zarówno w ultracentryfudze jak i przy doprowadzaniu roztworu do izoelektrycznego punktu, wypadają w formie osadu zarówno normalne nukleoproteiny zawarte w komórce, jak i białko wirusa X, będące nukleoproteinem o zbliżonym składzie.

Połączenie metody chromatograficznej z zastosowaniem mikroskopu elektronowego pozwoliło w czasach ostatnich na dokładne oddzielenie białka wirusa X od normalnego białka cytoplazmatycznego. Na pasku bibuły chromatograficznej oddzielone białko normalne i białko wirusowe było naświetlane promieniami U. V., celem dokładnego, na skutek różnic w absorbcji światła, umiejscowienia białka wirusa X. Miejsce zawierające białko wirusowe było wycinane, poddane ekstrakcji i badane w mikroskopie elektronowym. Uzyskano w ten sposób kryształy wirusa X oddzielone całkowicie od komórkowej treści (R a g e t l i i inni 1955).

Trudno dające się wyodrębnić z żywej roślinnej tkanki niestałe wirusy roślinne, do których w pierwszym rzędzie należy ziemniaczany wirus X, występujące z reguły w komórce w małej ilości (wydajność wirusa X wynosi średnio 100 mg na litr soku), w swoich własnościach bio-fizycznych upodobnione do nukleoproteinów komórki, tworzą ze związkami enzymatycznymi, zawartymi w komórkach, luźne kompleksy. Normalne białko komórkowe jest z enzymami komórkowymi silniej zespolone. Tym się tłumaczy być może większa nietrwałość „in vitro" zdrowego białka komórkowego w porównaniu z białkiem wirusa X, a być może i słabsze tego pierwszego własności antygenowe (patrz niżej).

Szereg opisanych poprzednio zjawisk biologicznych jak: zmiany ilościowe białka wirusowego w zamkniętym systemie przemian metabolicznych jakim jest roślina, niestałość objawów zewnętrznych, polegających na rozmaitym reagowaniu komórkowej treści, zdają się widomie potwierdzać ścisłe zespolenie normalnego białka cytoplazmatycznego z mnożącym się równocześnie białkiem wirusa X w komórce.

D. ZIEMNIACZANY WIRUS S

Omawiając cechy diagnostyczne wirusa X nie można pominąć milczeniem w 1951 roku odkrytego przez v. S l o g t e r e n a w Holandii wirusa S, objawowo zbliżonego zarówno do wirusa Y jak i do wirusa X, jak się okazało bardzo rozpowszechnionego wśród ziemniaczanych upraw

europejskich. Zależnie od szczepu wirusa S i odmiany ziemniaka, wykazuje on różne objawy, trudno niekiedy uchwytne. Jednym z najbardziej typowych symptomów jest delikatne pomarszczenie liści, mozaika, bądź przejaśnienie zieleni całej powierzchni liścia. Pokrojowo rośliny są słabiej rozwinięte, o mniejszych liściach, odchylających się pędach. W wypadku łagodnej mozaiki na liściach wirus S objawowo nie da się na ziemniakach odróżnić od wirusa X. W późniejszym stanie rozwoju choroby coraz bardziej pomarszczone liście brązowieją, niekiedy występują na nich nekrotyczne plamki.

Wirus S przenosi się podobnie jak wirus X drogą mechanicznego potarcia, nie przenoszony jest natomiast przez owady. Przeszczepiony na tytoń nie wywołuje na nim objawów, tym samym metodami biologicznymi nie może być wykryty w tkance ziemniaka. Jedyną pewną metodą stwierdzającą obecność wirusa S w tkance ziemniaka jest serologiczna metoda aglutynacyjna.

Jest wysoce prawdopodobne, że wirus S jest rozpowszechniony wśród wszystkich upraw ziemniaczanych. Wszystkie losowo, metodami serologicznymi, przebadane w Holandii ziemniaki, pochodzące z Danii, Anglii, Niemiec, Francji, Włoch, Czechosłowacji i USA, wykazały obecność wirusa S. Ziemniaki porażone wirusem S produkują mniejsze bulwy, które najchętniej brane są jako materiał sadzeniakowy. Ponieważ wirus S nie był dotychczas wyróżniany, tym samym nie był selekcjonowany, jest on być może dzisiaj bardziej od wirusa X rozpowszechniony (R o z e n d a a l, B r u s t 1955).

2. WIRUS SMUGOWATOŚCI Y

A. NATURA BIAŁKA WIRUSA Y, PRZEBIEG CHOROBY

W porównaniu z ziemniaczanym wirusem X, wirus Y znajduje się w soku roślinnym w małej bardzo koncentracji, dochodzącej w przybliżeniu najwyżej do 1 mg na litr wyciśniętego soku. Ponieważ jednocześnie białko wirusa Y ulega niezmiernie łatwo denaturacji i jest silnie absorbowane przez normalne białko komórki roślinnej, wyodrębnienie go w czystym stanie napotyka na duże trudności (B a w d e n, P i r i e 1939). Ostatnio B a w d e n i N i x o n (1951) przy pomocy techniki złotowej wykryli w mikroskopie elektronowym delikatne pałeczki, zaledwie 10 mμ długie, które skłonni są identyfikować z wirusem Y.

Swymi fizyko-chemicznymi własnościami wirus Y jest zbliżony do stosunkowo wielkich nitek krystalicznych wirusa X. Jego elementarny skład chemiczny jest następujący: C = 50%, N = 16%, P = 0,4%, węglowodany = 3%.

Występując w tkance ziemniaka w tak małej koncentracji powoduje jednak wirus Y w roślinie, szczególnie w pewnych stadiach choroby, ostre symptomy zewnętrzne Pod wpływem wniknięcia do komórek gospodarza

drobin wirusa smugowatości zachodzi widocznie zaburzenie całego mechanizmu syntetyzującego w komórce. Jej metabolizm zostaje silnie zachwiany, odtwarzanie normalnych jej składników jest utrudnione, w konsekwencji zjawiają się symptomy (Bawden, Pirie 1953). Zaburzenie przemian wewnątrz-komórkowych prowadzi w pewnych okresach choroby do stanów letalnych, zamierania komórkowej treści. Jak wykazały badania serologiczne ostrość symptomów nie odpowiada bynajmniej ilości białka wirusowego w komórce (Marcus 1953).

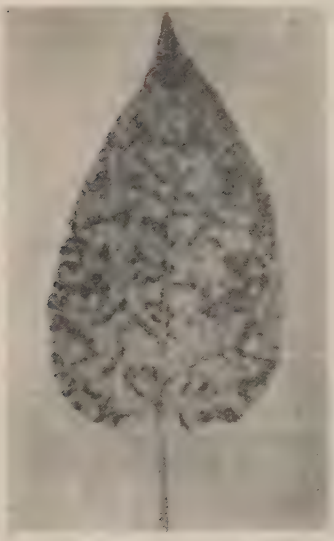
Skutkiem tych właściwości wirusa Y o objawach choroby, w konsekwencji o degeneracji całej rośliny, decydują nie tylko bardziej lub mniej wirulentne szczepy wirusa Y, ile w wyższym jeszcze stopniu biochemiczne właściwości komórkowej treści rośliny gospodarza. Odmiany ziemniaka, włączone do jednego zbiorowego gatunku *Solanum tuberosum*, pod względem reagowania na inwazje wirusa Y przedstawiają wielką różnorodność. Normalny metabolizm komórkowej treści u poszczególnych odmian ulega pod wpływem smugowatości zachwianiu w rozmaitym stopniu. Stąd jakość symptomów i stopień degeneracji roślin pod wpływem wirusa Y u rozmaitych odmian ziemniaków nie są jednakowe (Bawden, Kassanis 1946, Roland 1946).

Inaczej przedstawia się sprawa w wypadku tytoniu. Różnice symptomów zależne są u tej rośliny tylko od szczepów wirusa Y. Wirus Y w najczęstszej swej postaci przeszczepiony z ziemniaków na siewki tytoniu daje te same objawy: w pierwszym okresie choroby przejaśnienie nerwów liści, tworzących charakterystyczną siateczkę. Z czasem wzdłuż nerwów zjawiają się ciemnozielone pasy skupionych chloroplastów. Podobne objawy występują na innych roślinach z rodziny *Solanaceae*, np. *Cyphomandra betacea* (rys. 3). Jeden z poznanych szczepów wirusa Y daje na tytoniu objawy nekrozy, które są przejściowe (Bawden, Kassanis 1951).

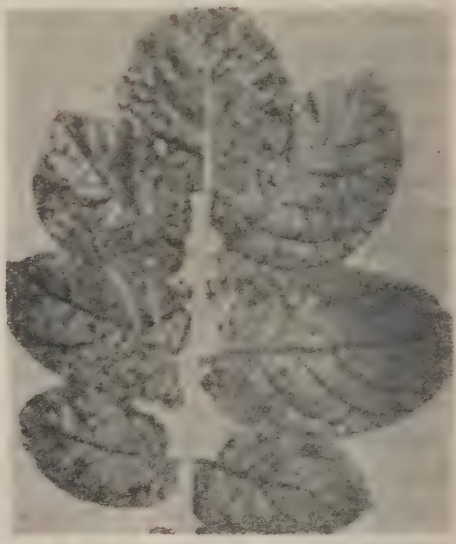
U ziemniaków w normalnych wypadkach przebiegu choroby wirus Y od miejsca zakażenia na liściu w ciągu 2 do 3 dni przesuwa się do wiązek sitowo-naczyniowych najpierw liścia a potem łodygi. Z przesuwaniem tym związane jest zamieranie komórek. W dwa do trzech tygodni od chwili zakażenia, komórki, które ulegają nekrozie, widoczne są pod postacią czarnych smug biegnących wzdłuż nerwów liści, u których często zasychają na skutek tego wierzchołki (rys. 4). Na rozwijającej się roślinie ogonki wcześniej przez smugowatość opanowanych liści dolnych często całkowicie zamierają, powodując zwisanie liści w dół.

W pierwszym okresie rozwoju choroby wyciśnięty sok z porażonych liści nie daje serologicznej reakcji z odpowiednim antiserum. Koncentracja wirusa ograniczona w tym stadium choroby do tkanki przewodzącej przy silnej zjadliwości, jest widocznie tak niską, że metodą precypitacji nie może być stwierdzona (Marcus 1953).

Znane są odmiany ziemniaków u których na skutek silnej wrażliwości na wirusa Y choroba ma inny przebieg. Natychmiast po okresie inkubacji, mnożący się w tkance liści wirus Y, powoduje tak silne lokalne



Rys 3. Objawy wirusa Y na liściu *Cyphomandra betacea*



Rys. 4. Objawy smugowatości na liściach ziemniaka

zjawisko zamierania razem zgrupowanych komórek, że zeschnięty, zmarniały w tym miejscu liść jest barierą, odcinającą możliwość dalszego rozszerzania się choroby. Na skutek powstania tego rodzaju zjawiska, odmiany te w istocie swojej nadwrażliwe na wirusa Y w praktyce są przeciw temu schorzeniu odporne.

Tak samo jak istnieją odmiany ziemniaków nadwrażliwe na wirusa Y, tak samo również spotykamy się niekiedy z odmianami w wysokim stopniu toleranckimi w stosunku do tego schorzenia. Rozszerzający się w ich tkankach wirus Y w pierwszym okresie choroby nie powoduje objawów nekrotycznych czernienia nerwów liściowych. Po 3—4 tygodniach od momentu zarażenia młodej rośliny, a niekiedy dopiero w roku następnym u odmian tych zjawia się na liściach mozaika.

W normalnych wypadkach przebiegu choroby nekrotyczne objawy zczernienia nerwów i zasychania wierzchołków liści są symptomami przejściowymi. Niekiedy w tym samym jeszcze roku, w parotygodniowym odstępie czasu, na liściach górnych ziemniaczanych łętów zjawia się mozaika. Komórki tych liści nie ulegają nekrozie, jedynie zmniejsza się w ich komórkach ilość chloroplastów. Zjawienie się mozaiki na całej powierzchni liści wiąże się jednocześnie ze wzrostem wirusa Y w soku komórkowym, który wyciśnięty z tkanki liściowej, w silnej

wprawdzie koncentracji 1 do 20, daje jednak wyraźną kłaczkowatą precypitację z odpowiednim antiserum (Bawden, Kassanis 1946).

Wędrowanie wirusa Y przede wszystkim drogami przepływu asymilatów, prowadzić musi do przedostania się białka wirusowego do tkanki naczyniowej i zapasowych łodyg podziemnych, jakimi są bulwy. Sprawą doniosłą jest stwierdzenie czy rozchodzenie się wirusa Y od miejsca zakażenia, w ciągu jednego okresu wegetacyjnego prowadzi do opanowania całego systemu wiązek przewodzących w roślinie, tym samym wszystkich wytworzonych przez roślinę bulw.

Marcus (1953) w polowych i wazonowych doświadczeniach, stosując sztuczne zakażenie ziemniaków szczepem wirusa Y, otrzymanym z ziemniaka i tytoniu, wykazał brak ciągłości w rozszerzaniu się białka wirusowego w roślinie. W warunkach polowych stwierdził on obecność wirusa Y w tych bulwach, które były związane z zarażonym pędem i korzystały bezpośrednio z jego asymilatów. Im później ziemniak został zakażony wirusem Y, tym więcej było pod krzakiem bulw całkowicie wolnych od smugowatości. Nasilenie wirusa Y w oczkach pojedynczej bulwy jest też niejednakowe. Wirus Y lokalizuje się, zdaniem tego autora, przede wszystkim w oczkach koronowych.

Rośliny wyrosłe w roku następnym z porażonych bulw są najczęściej skarlałe, o liściach drobnych, bardziej lub mniej pomarszczonych, pokrytych mozaiką. Ostrość objawów zależna jest w tym okresie choroby w znacznym stopniu od drugiego partnera, występującego razem ze smugowatością, wirusa X. Podobnie jednak jak w pierwszym roku rozwoju choroby, tak samo i w drugim i następnych latach, decydującym o symptomach jest reagowanie poszczególnych odmian na kompleks wirusa Y z wirusem X. U odmian wrażliwych spotykamy ostrą kędzierzawkę: skarlałe 10 do 20 cm wysokie rośliny, o małych skręconych liściach, pokrytych mozaiką. Objawami łagodniejszymi są mozaikowate liście silniej lub słabiej pomarszczone.

Obecność wirusa Y może się też niekiedy manifestować tylko zahamowaniem rozwoju rośliny (rys. 5 i 6). Wirus Y może się wreszcie znajdować w stadium całkowicie utajonym. W normalnie rozwiniętych roślinach może on być w tym wypadku wykryty tylko biologicznymi metodami. Zjawisko to wystąpiło w sposób szczególnie wyraźny w wieloletnich doświadczeniach, przeprowadzanych równolegle na niżu pod Krakowem i w klimacie górskim w Zakopanem (Kozłowska 1954). Szereg wyselekcjonowanych rodów sprowadzonych w 1946 roku z Pomorza uległo w warunkach krakowskich w roku 1947 zarażeniu wirusem Y. W następnym 1948 roku rody te przeniesione na Koziniec do Zakopanego, wykazały objawy wirusa Y, zarówno smugowatości jak i mozaiki na wszystkich liściach i pędach. Z roku na rok sadzone te same krzaki w roku 1950, w którym panowały dla rozwoju ziemniaka

w górach warunki optymalne, nie przejawiły zupełnie objawów zewnętrznych wirusa Y. Wyglądem zewnętrznym rośliny te nie różniły się niczym od zdrowych rodów pomorskich, u których wirus Y nie był

Fot. Z. Zwolińska

Rys. 5. Ziemniak (ród 18), rozwój normalny

stwierdzony. Jednak sok tych ziemniaków przeszczepiony na tytoń wywołał na tym ostatnim charakterystyczne dla wirusa Y przejaśnienia nerwów liściowych. W latach następnych mniej korzystnych dla rozwoju ziemniaka, smugowatość i mozaika ponownie wystąpiły na liściach.

Fot. Z. Zwolińska

Rys. 6 .Ziemniak (ród 18) zahamowany w rozwoju na skutek wirusa Y

U odmian ziemniaków wrażliwych na wirusa Y i u odmian wykazujących tolerancję w stosunku do tego schorzenia, stwierdzona została ważna różnica biologiczna. Odmiany ziemniaków, na skutek nadwrażliwości tkanki liściowej polowo odporne na wirusa Y, przy przeszczepianiu chorej tkanki do miękiszu bulw, trudno ulegają zakażeniu. Gdy ono jednak nastąpi, nekroza tkanek pojawia się na rozwijających się liściach. Inaczej pod tym względem zachowują się bulwy odmian mniej lub bardziej tolerancki w stosunku do wirusa Y. Odmiany, które reagują tylko mozaiką i delikatnym pomarszczeniem liści przy zakażeniu bulw, bardzo łatwo ulegają infekcji. Ta ich podatność na przyjmowanie

zarazka jest zapewne przyczyną, że są one często nosicielami infekcji (Rozendaal 1954).

Z intensywnością i jakością objawów, powodowanych wirusem Y, idzie w parze spadek plonów. U większości odmian waha się on od 40—60%.

B. SZCZEPY WIRUSA Y

Wirus Y znany jest pod postacią licznych szczepów (Bawden, Kassanis 1947). Najczęściej spotykane szczepy wykazują znacznie większą zjadliwość w stosunku do ziemniaka niż w stosunku do tytoniu. Pod tym względem wirus Y różni się zasadniczo od wirusa X. Szczepy, które na rozmaitych odmianach ziemniaków wywołują słabszą lub silniejszą nekrozę tkanek, nie wywołują jej zupełnie na liściach tytoniu. Objawy występujące na tych ostatnich w istocie swojej są do siebie podobne, różnią się jedynie nasileniem. Jak to zaznaczono wyżej są to u tytoniu zawsze przejaśnienia nerwów liści, przechodzące później na liściach starszych w ciemnozielone obrzeżenie żyłek. Wyraźne objawowe różnice między szczepami wirusa Y występują tylko na ziemniaku. Przy czym ze względu na rozmaite reagowanie odmian ziemniaków na inwazje wirusa Y, różnice między szczepami należy ustalać w odniesieniu do poszczególnych ziemniaczanych odmian.

Podobnie jak to miało miejsce w wypadku szczepów wirusa X, szczepy wirusa Y wykazują zjawisko interferencji: jeden szczep uodparnia roślinę przeciw zakażeniu szczepem pokrewnym. Dobrze zbadany np. szczep PVC wirusa Y (C. Bawden), nie przenoszony przez mszyce, a jedynie drogą bezpośredniego kontaktu, uodparnia zarówno ziemniaka jak tytoń przeciw zakażeniu szczepem Y_1 (*Solanum virus 2* Orton).

W ostatnich latach odkryty został poprzednio nie dostrzegany, szczep wirusa Y, o odrębnych niż powyżej opisane właściwościach. Jest nim szczep TVNV, wyizolowany po raz pierwszy z ziemniaków na ich naturalnych stanowiskach w Ameryce Południowej pod nazwą „Necrose das Nervura" (Nobrega, Silberschmidt 1944). Szczep ten opisany dokładnie przez Bawden'a i Kassanis'a (1951), zaszczepiony na młodych siewkach tytoniu, po 10 dniach wywołuje skręcenie i deformacje liści oraz nekrozę żyłek. Pierwsza reakcja jest bardzo silna, w późniejszych stadiach rozwoju rośliny objawy nekrozy słabną, na liściach zjawia się mozaika. Objawy te uderzająco przypominają kompleks wirulentnych ras wirusa X sprzęgniętych ze smugowatością. Z tej przyczyny szczep TVNV dotychczas uchodził uwadze badaczy. Jedynie przeszczepienie porażonych liści tytoniu na *Datura stramonium*, która jest na wirusa Y odporna a przyjmuje wirusa X, może rozstrzygnąć, czy w badanych ziemniakach nie mamy do czynienia ze szczepem TVNV wirusa Y.

W przeciwieństwie do najczęściej spotykanego wśród ziemniaczanych upraw szczepu Y_1 (*Solanum virus 2* Orton), szczep TVNV wywołuje na szeregu odmianach ziemniaków słabe objawy delikatnej mozaiki, bądź pozostaje w stanie zupełnie bezobjawowym.

Pod względem własności serologicznych szczepy wirusa Y, aczkolwiek niewątpliwie są tak zwanymi antygenami kompleksowymi, są sobie bardzo bliskie. W wypadku wirusa X szczepy nie różniące się niemal wcale własnościami serologicznymi, wykazywały zjawisko interferencji. Nowo opisany szczep TVNV wirusa Y zachowuje się pod tym względem odmiennie. Porażone tym szczepem ziemniaki i tytoń ulegają zakażeniu szczepem Y_1 i szczepem PVC (C. Bawden).

C. ROZSZERZANIE SIĘ WIRUSA Y W PRZYRODZIE, ROLA OWADÓW

W przyrodzie wirus smugowatości przenoszony jest najczęściej przez mszyce *Aphis rhamni* i *Myzus persicae*. Przenoszenie odbywa się natychmiast bez okresu inkubacji w ciele owada. 11 do 60 sekund żerowania na chorym liściu wystarcza by mszyca była rozsadnikiem infekcji. Przy czym nakłucie niezbyt głębokie chorego liścia przez czas krótki, do 2 minut i natychmiastowe przeniesienie się owada na roślinę zdrową, daje najwyższy stopień zakaźności. Mszyce nieuskrzydlone już po kilku minutach tracą zdolność zakaźną. Jeśli po opuszczeniu źródła infekcji są one odcięte od pożywienia, ich zdolności infekcyjne mogą się przedłużyć najwyżej do kilku godzin. Jednak w wyższej temperaturze 35° C czas ten jest znacznie krótszy (Branley 1954). Mszyce, które siedzą ponad 1 godzinę na zarażonej roślinie przestają być rozsadnikiem choroby. Tym się tłumaczy, dlaczego nieuskrzydlone mszyce bezpośrednio, wcale bądź w słabym stopniu, powodują rozszerzanie się smugowatości (Watson, Roberts 1940). Ta nietrwałość wirusa Y w ciele owada sprawia, że głównym rozsadnikiem infekcji są naloty owadów uskrzydlonych, bardzo krótko przebywających na zarażonych i zdrowych roślinach (Roland, Fagel 1949, Broadbent, Tinsley 1951). Jednak i w tym wypadku, jeśli przeciąg czasu między żerowaniem na roślinie zawirusowanej i zdrowej trwa zbyt długo, zakażenie nie następuje.

Jeszcze jeden czynnik potęguje zdolności infekcyjne owadów, jest nim stan wygłodzenia bezpośrednio przed żerowaniem na chorych liściach. Jeżeli owady przynajmniej w ciągu godziny są odcięte od źródła pokarmu, a potem dostają się na chore rośliny na przeciąg nie dłuższy od 2 minut, zakażenie roślin odbywa się w największym procencie (Watson, Roberts 1940).

Mszyce, żerując na liściach przebijają narządami pyszczkowymi skórkę, *epidermis*. Trwa to około 5 minut. Po 15 minutach zaledwie 10% żerujących mszyc sięga tkanki sitowej floemu, dopiero po godzinie liczba ta

wzrasta do 50%. Badania przeprowadzone nad intensywnością pobierania soków z liści przez mszyce w ciągu różnych okresów czasu z roślin, zawierających izotopowy, znakowany fosfor P^{32}, dały interesujące wyniki (Marion i inni 1953). Wygłodzone uprzednio mszyce w ciągu pierwszej godziny pobierały jednostkowo 10 µg soku, w czasie od 1—4 godzin około 40 µg/1 godz., w czasie między 6 a 24 godziną 17 µg/1 godz. W doświadczeniach tych ważne jest stwierdzenie intensywnego pobierania przez mszyce soku z liści po upływie godziny, z momentem gdy sięgają one narządami pyszczkowymi floemu, w którym jak wiemy najintensywniej gromadzi się wirus smugowatości. Mimo to, jak to zaznaczono wyżej, wszystkie doświadczenia wykazują zgodnie, że mszyce po kilkugodzinnym żerowaniu przenoszą wirus smugowatości w bardzo małym procencie. Dwuminutowe żerowanie na roślinie chorej jest dla zakażenia liści zdrowych najkorzystniejsze. Białko wirusowe musi zatem dostawać się do mszyc z komórek skórki. Jest wysoce prawdopodobne, że w czasie długi czas trwającego, intensywnego ssania soków z tkanki sitowej, obficiej tworzące się wydzieliny pyszczkowe owada działają rozkładowo na wciągane przez owada białko wirusowe.

Aczkolwiek w naszym kraju *Aphis rhamni* przenosi wirus Y na równi z *Myzus persicae*, jednak w warunkach polowych *Myzus persicae*, szybciej przenosząca się z rośliny na roślinę, większą odgrywa rolę (Siemaszkowa 1952).

O rozszerzaniu się wirusa Y decydują trzy czynniki: 1) obecność wektorów przenoszących infekcje, 2) warunki sprzyjające ich lotom, wreszcie 3) obecność roślin chorych będących źródłem zarazków.

Spełnienie wszystkich warunków sprzyjających optymalnemu przenoszeniu się infekcji przez mszyce, trafia się w przyrodzie stosunkowo rzadko. Liczni badacze zgodnie ustalają następujące warunki klimatyczne, najkorzystniejsze dla aktywnych lotów mszyc i dla rozszerzania się smugowatości na ziemniaczanych polach. Przenoszenie mszyc pasywne silnymi wiatrami na znaczne odległości małą przy zakażeniach odgrywa rolę (Müller, Unger 1952). 1) Temperatura średnia dnia od 18° do 22°, 2) wilgotność powietrza poniżej 75%, wreszcie 3) siła wiatru nie przekraczająca 3,6 m/sek, wahająca się około 2 m/sek (Davies, Whitehead 1932—1937), Siemaszkowa (1952), Müller, Unger (1952). Haine (1954) dodaje ważne jeszcze obserwacje. Chociaż przefruwanie mszyc z jednej rośliny na drugą odbywa się najczęściej przy braku wiatrów lub przy szybkości dochodzącej do 3,75 m/sek, to jednak jeżeli owad po przejściu w stan uskrzydlony długo nie może wzlecieć, lot odbywa się przy wiatrach silniejszych np. 7,2 m/sek. W wypadku bardzo często panujących wiatrów zmiennych, owady wyzyskują zawsze chwilowe pauzy, by błyskawicznie unosić się w górę.

Choć zachowanie się mszyc i ich loty zależą w pierwszym rzędzie od pogody, jednak oficjalne dane meteorologiczne, jakimi dysponujemy, nie zawsze wykazują ścisłą korelację z przejawami życia tych owadów. Jest to wywołane tym, że stosunki klimatyczne panujące wewnątrz ziemniaczanego krza, nie odpowiadają ściśle danym notowanym przez meteorologiczne instrumenty na stacjach. *Myzus persicae* z reguły siedzi po spodniej stronie starszych dolnych liści, znajdujących się w cieniu, zasłoniętych od wiatru. Mikroklimat tam panujący odbiega niekiedy bardzo znacznie od otaczającej atmosfery (Broadbent 1953). Różnica temperatur między dolnymi a górnymi, wystawionymi na bezpośrednie słoneczne promieniowanie liśćmi dochodzić może do 3° C, niekiedy wyżej (Waggener 1952). Mszyce opuszczając dolne liście dostają się od razu do warstw powietrza o wyższej temperaturze i mniejszej wilgotności względnej.

Dla rozszerzania się infekcji sprawą niezmiernie doniosłą jest czas w którym warunki klimatyczne sprzyjają lotom. Im uskrzydlone mszyce wcześniej się pojawiają i tym samym żerują na młodszych roślinach, tym procent zakażonych roślin jest większy. (Whitehead i inni 1945). Wczesne sadzenie zwiększa na ogół podatność ziemniaków na zakażenie smugowatością (Broadbent i inni 1952).

Wiosenne loty mszyc, powodujące największe rozszerzanie się wirusowych schorzeń, zależne są w znacznym stopniu od warunków sprzyjających przezimowaniu tych owadów. *Myzus persicae* w stadium jaja zimuje w naszym kraju najczęściej na drzewach brzoskwiniowych, niekiedy na innych gatunkach rodzaju *Prunus*. W stanie dojrzałym spędza porę zimową na roślinach szklarniowych. Stąd najliczniej pojawiają się te owady blisko miast i ludzkich osiedli.

Loty mszyc, zależne od warunków klimatycznych, omijają pobrzeża morskie i góry. Rejony te cechują słabe pojawy mszyc lub całkowity ich brak (Roland 1946). W terenach niżowych roczne, miesięczne, a nawet dzienne wahania klimatyczne decydują o pojawie i przenoszeniu się uskrzydlonych owadów z rośliny na roślinę.

Ujęcie jednak wszystkich razem działających czynników i związanie ich z ilością porażonych roślin, nastręcza duże trudności. Bonde, Schultz, Reliegh (1934) podają dane z 19 lat, gdzie nasilenie chorób wirusowych stało w prostym stosunku do ilości pojawiających się mszyc, dotyczyło to jednak w pierwszym rzędzie liściozwoju, a nie smugowatości. Niezaprzeczonym jest jednak również fakt, stwierdzony niejednokrotnie, braku ścisłej zależności między ilością zakażających owadów, a pojawem smugowatości na ziemniaczanych polach (Baumann 1954, Broadbent 1950, Doncaster, Gregory 1948). Podobnie znane są na niżu rejony, np. Pomorze Zachodnie, Holandia,

Irlandia itd., w których smugowatość należy do rzadkości, co stosunkami klimatycznymi nie da się wyłącznie wytłumaczyć.

Broadbent i inni (1952) stwierdzili np. bezpośredni wpływ nawożenia na słabszy lub silniejszy pojaw mszyc na ziemniakach. Ziemniaki wcześnie sadzone, nawożone na wiosnę obornikiem, były przez dwa lata z rzędu silniej nawiedzane przez mszyce, niż ziemniaki nie nawożone. Podobny wpływ miały duże dawki siarczanu amonu i superfosfatu.

Całe zagadnienie wirusa smugowatości, oraz przenoszących zakażenie mszyc, jest bardzo skomplikowane, wymagające włączenia niewątpliwie szeregu innych jeszcze czynników, mających wpływ na rozwój samej rośliny i na reagowanie jej komórkowej treści na inwazje wirusowego białka.

3. WYKRYWANIE CHORÓB WIRUSOWYCH ZIEMNIAKÓW METODĄ WSKAŹNIKOWĄ BULW (TUBER INDEX METHOD)

Doniosłe dla praktycznej hodowli zagadnienie wykrywania wirusowych chorób w bulwach ziemniaków, przeznaczonych na sadzenie, było przedmiotem licznych badań i doświadczeń. Jedną z najstarszych, jednocześnie najprostszych, stosowanych do dnia dzisiejszego metod jest metoda wskaźnikowa bulw. Polega ona na wycinaniu z bulwy ziemniaka w czasie kończącego się okresu spoczynku, od końca stycznia do kwietnia, pojedynczego lub kilku oczek, na wysadzaniu ich do doniczek w ogrzewanej szklarni i ocenianiu objawów wirusowych chorób na pierwszych wyrośniętych liściach.

Metoda ta była badana i stosowana w Polsce przez L. Garbowskiego (1936) i K. Zaleskiego (1953) i przez nich została dokładnie opisana. Jest ona w powszechnym użyciu w Niemczech (Köhler 1940), Szwajcarii (Wahlem 1936), w Holandii (Zaleski 1939), w Kanadzie (Baribeau, Gagnon 1946), w Stanach Zjednoczonych (Stuart 1932), wreszcie w ZSRR pod nazwą „metod indeksacji kłubniej" (Bukasow i Kamieraz 1948).

W swoim założeniu metoda ta polega na ocenianiu chorób wirusowych na podstawie wyłącznie objawów zewnętrznych, w sposób najwyraźniejszy występujących na pierwszych rozwijających się liściach. Ponieważ najczęściej występującym objawem chorób wirusowych na liściach jest mozaika, związana zarówno z wirusem X jak i Y, tym samym przy pomocy metody wczesnego wysadzania oczek głębsze wniknięcie w jakość i istotę wirusowego schorzenia jest niemożliwe. Ocena dotyczy jedynie obecności lub braku choroby wirusowej w badanej bulwie, najczęściej bez precyzowania z jakim wirusem mamy do czynienia. Tak częste przechodzenie wirusa X i Y w bezobjawowe stadia utajone, nie mogą być też oczywiście na drodze obserwacyjnej wykryte.

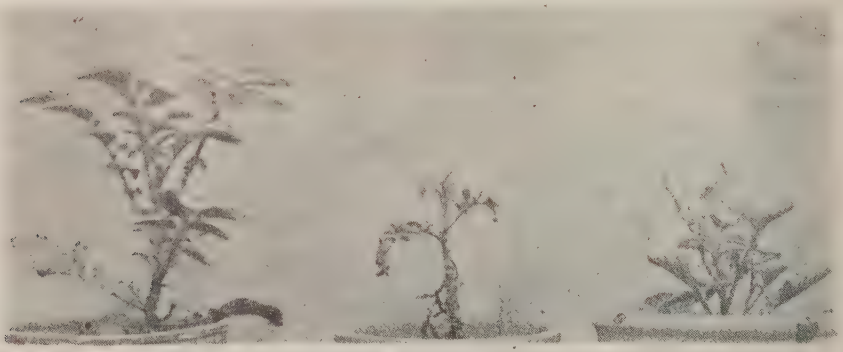
Z punktu widzenia metodycznego doniosłą sprawą jest uwzględnienie wpływu warunków zewnętrznych, w których przebiega doświadczenie. Zarówno temperatura panująca w szklarni, jak w wyższym jeszcze stopniu rodzaj gleby w doniczkach do których wsadzone są oczka wycięte z bulw, mają wpływ na występowanie bądź utajenie objawów chorób wirusowych. Jak to wykazał Zaleski (1953) metoda wskaźnikowa bulw ujawnia największy procent roślin zawirusowanych przy użyciu w szklarni ziemi kompostowej, mniejszą zaś przy użyciu gleb mineralnych.

Rys. 7. Wyrośnięte 1 i 7 oczko z pojedynczej bulwy porażonej wirusem X i Y (ród 53)

Drugą niemniej doniosłą sprawą jest rozmieszczenie białka wirusowego w bulwie ziemniaczanej, które nie jest równomierne. Zgromadzone jest ono przede wszystkim w obiegającej bulwę wiązce sitowo-naczyniowej i pojedynczych związanych z nią oczkach (Prochal 1953). Okazało się ponadto, że nasilenie wirusa X w pojedynczych oczkach i wiązce nie jest również jednakowe. W okresie zimowym od jesieni do wiosny białko wirusowe ulega przemieszczeniu od miejsca przyczepu do partii wierzchołkowych. Jedynie w wypadku krańcowej degeneracji, wirus X był stwierdzony czułą serologiczną metodą odchylenia dopełniacza, we wszystkich fragmentach bulwy. W pozostałych wypadkach słabszego nasilenia choroby, w okresie wczesnowiosennnym puszczania kiełków, największe nagromadzenie białka wirusowego jest z reguły w koronowych oczkach szczytowych, a słabsze w pozostałych, ustawionych na skrętnicy. Nierzadkie są wypadki, że wyrastająca z oczka szczytowego roślina jest skrajnie porażona smugowatością sprzężoną z wirusem X, natomiast ziemniaki wyrastające z oczek niżej położonych mają wygląd pozornie zdrowy (rys. 7 i 8). Zjawisko to dość często można obserwować w uprawach polowych, gdyż na jednej i tej samej roślinie,

wśród kilku pędów zdrowych znajdują się pędy z wyraźnymi objawami mozaiki.

Zgodnie z tymi faktami, przy badaniu zdrowotności bulw wskaźnikową metodą, należy wysadzać do doniczek w szklarni oczka szczytowe, gdyż wtedy jedynie istnieje największe prawdopodobieństwo



Rys. 8. Wyrośnięte 1, 4 i 5 oczko z pojedynczej bulwy porażonej wirusem X i Y (ród 385)

wykrycia objawowej choroby wirusowej, tkwiącej w bulwie. Wysadzając, jak to podaje Zaleski (1953), nie pojedyncze oczka, ale całe ćwiartki bulw, zawierające kilka oczek rozmieszczonych na całej długości bulwy, otrzymujemy wynik bardziej jeszcze pewny.

Poza niezmiernie prostą w swym założeniu wyżej opisaną metodą wstępnej hodowli kiełków, były podejmowane wielokrotnie próby oceny zdrowotności bulw ziemniaków przeznaczonych na sadzenie metodami fizyko-chemicznymi. Próby te nie dały jednak dotychczas zadowalających wyników. Metody te opierają się na ogół na określaniu własności oksydo-redukcyjnych miąższu kłębów zdrowych i chorych drogą elektrometryczną bądź kolorymetryczną.

Potencjał oksydo-redukcyjny oznaczany symbolem *rH*, wyznaczający stosunek substancji utleniających do redukujących, mierzony przy pomocy potencjometru, nie jest w bulwach ziemniaków wielkością stałą. Według badań Heya (1933) i Wartenberga (1936) *rH* kłębów porażonych chorobami wirusowymi waha się w innych granicach, niż kłębów zdrowych. Okazało się jednak, że wahania te zależne są poza zdrowotnością od szeregu innych czynników jak np. od rodzaju gleby, warunków klimatycznych, zmiany środowiska itd.

Stosowanie prostych metod kolorymetrycznych, jak między innymi wstawianie do miąższu bulw blaszek miedzianych i obserwowanie zabarwienia tkanki położonej w pobliżu, nie wytrzymało również próby życia (Bechhold, Erbe 1932, Kameraz, Aniklew 1937). Wybitne różnice w zabarwieniu związane niewątpliwie z rozmaitymi sto-

sunkami, oksydacyjno-redukcyjnymi panującymi w bulwie, zależne są w wysokim stopniu od odmiany i warunków środowiska. To samo dotyczy metody, polegającej na szybkości utleniania żywicy gwajakowej pod wpływem roztartego miąższu bulwy (K a h o 1935).

Jedną z charakterystycznych cech miąższu bulwy ziemniaka jest jego pojemność buforowa, mierzona szybkością z jaką zachodzi zmiana przewodnictwa w miazdze przy miareczkowaniu jej normalnym kwasem i ługiem (I n g o l d 1929). Właściwość ta waha się w bulwach ziemniaków w dużych granicach. Bulwy opanowane chorobami wirusowymi są silniej zbuforowane niż bulwy zdrowe (W a r t e n b e r g 1938).

M. D w u r a ź n a

4. OBJAWY WIRUSA X i WIRUSA Y NA ZIEMNIAKACH

Pierwotnie klasyfikacja chorób wirusowych ziemniaka oparta była jedynie na objawach zewnętrznych. Obecnie dla poznania istoty schorzenia stosuje się cały szereg metod anatomiczno-histologicznych, biologicznych, chemiczno-fizycznych i serologicznych, dzięki czemu jesteśmy w stanie niejednokrotnie identyczne objawy wiązać w poszczególnych wypadkach z odpowiednimi chorobami wirusowymi. Niemniej ocena symptomatologiczna w uprawach ziemniaków, szczególnie w stacjach hodowlano-badawczych, ma do dziś dnia pierwszorzędne znaczenie.

Nie dające się zewnętrznie odróżnić identyczne objawy chorób wirusowych dotyczą w pierwszym rzędzie schorzeń wywołanych przez ziemniaczanego wirusa X i wirusa Y. Sprawą doniosłą dla ogólnej degeneracji rośliny jest fakt, że występują one bardzo często równocześnie na tym samym osobniku.

Wirus X jest najbardziej rozpowszechnionym wirusem ziemniaczanym. Zależnie od bardziej lub mniej wirulentnego szczepu daje na ziemniakach krańcowo różne objawy zewnętrzne. Łagodne szczepy z reguły nie dają na ziemniakach żadnych chorobowych objawów. Szczepy wirulentne, w zależności od odmiany ziemniaków, mogą wywoływać różne objawy od słabej mozaiki, poprzez silną, aż do nekrozy liści i pędów.

Podawana ilość szczepów wirusa X jest różna u rozmaitych autorów zależnie od bardziej lub mniej subtelnego ujęcia objawów.

B a w d e n (1948) szereguje wszystkie szczepy wirusa X w 4 grupy. Jeden z nich szczep B wykazał tak daleko idącą różnicę objawową i serologiczną, że został zakwalifikowany przez niektórych autorów jako odrębne schorzenie wirusowe pod nazwą ziemniaczany wirus B. Pozostałe szczepy to:

X^M — szczep awirulentny, nie wywołujący objawów zewnętrznych,
X^Y — powodujący wyraźną mozaikę międzyżyłkową,
X^N — dający objawy mozaiki i nekrozę wierzchołków liści.

Salaman (1938) w wyczerpującej monografii ujmuje wielką zmienność wirusa X w sześć wyraźnie różniących się szczepów:

X^H — utajony, nie dający żadnych chorobowych objawów na ziemniakach,

X^G, X^L — wywołujące słabą mozaikę liści, wyrażającą się w modulacji zieleni od barwy żółtawej do ciemno-zielonej. Objawy te widoczne są we wczesnym okresie wegetacyjnym rośliny, później słabną lub całkowicie się maskują,

X^S dający na niektórych odmianach ziemniaków: President, Arran Victory wyraźną mozaikę, która utrzymuje się już bez zmiany do końca wegetacji. Poza tym pojawić się mogą nieliczne plamki nekrotyczne na młodszych liściach. Inne odmiany jak Epicure, Arran Crest, King Edward ulegają bardzo silnej nekrozie z wynikiem śmiertelnym.

X^D — tworzący na wielu odmianach ziemniaków liczne plamki nekrotyczne na liściach, oraz powodujący opadanie liści, dając efekt „drzewa palmowego".

X^N — powoduje na ziemniakach wyraźną nekrozę międzyżyłkową liści, a czasem i całego liścia. W odróżnieniu od wyżej opisanych szczepów, X^N tworzy na ziemniakach nekrozy, które w miarę rozwoju rośliny powiększają się i powodują zamieranie całych liści i zahamowanie wzrostu rośliny.

Dużo większą jeszcze ilość szczepów wirusa X wyosobnili Köhler i Ross (1951, 1953), wykazując subtelne różnice w objawach zależnie od odmiany ziemniaka, z której dany szczep wirusa X pochodził. Na podstawie temperatury inaktywacji podzielili oni je na 2 duże grupy:

X^E — posiadające temperaturę inaktywacji = 75°C,
X^N — „ „ „ = 68°C.

W obydwu grupach wyodrębnili szczepy powodujące nekrozę wierzchołkową na jednych, a mozaikę na drugich odmianach. Bardziej zjadliwymi szczepami, wywołującymi ostre objawy chorobowe na ziemniakach, okazały się szczepy z grupy E.

Wirus X występujący w licznych szczepach w naszych uprawach polowych ujęliśmy, opierając się w pierwszym rzędzie na podziale Salamana, w cztery wyraźnie różniące się między sobą grupy:

X^H — szczep bezobjawowy, którego obecność stwierdzono przez kilkakrotne przeszczepianie go z ziemniaka na tytoń i w dal-

szym ciągu z tytoniu na tytoń i paprykę, otrzymując wreszcie na tytoniu objawy bardzo słabej mozaiki. Na tytoniach bezobjawowych może być wykryty w świetle U. V. (patrz strona 44).

X^G — szczep ten wywołuje słabą mozaikę na ziemniakach, występującą tylko w początkowym stadium rozwoju rośliny. Po przeszczepieniu soku z łęt, wykazujących objawy, na rośliny testowe (tytoń i bieluń) występuje lekka mozaika, ale tylko na 3 młodocianych liściach tytoniu i utrzymuje się ona na nich aż do chwili zżółknienia liści, o ile temperatura w szklarni nie przekracza 20°C. W wyższej temperaturze objawy zanikają.

X^L — porażone tym szczepem ziemniaki dają objawy silnej mozaiki. Zarysowują się wyraźnie jasno- i ciemno-zielone plamy na blaszce liściowej, które maskują się w późniejszym okresie wegetacyjnym rośliny. Po przeszczepieniu na tytoń i bieluń występują silne objawy mozaiki o „szyldkretowej strukturze "(rys. 9).

Rys. 9. Mozaika z nekrotycznymi plamami na liściu tytoniu

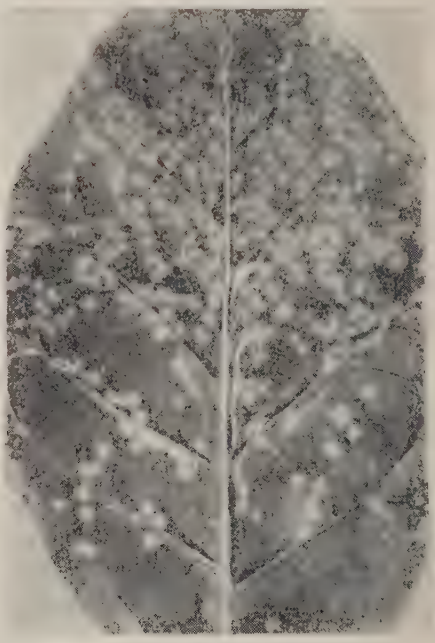
X^S — szczep ten daje objawy nerkozy silnej na liściach oraz bardzo silnej mozaiki, utrzymującej się już do końca wegetacji. Po przeszczepieniu na tytoń i bieluń, jako pierwsze objawy występują w miejscu szczepienia nekrotyczne pierścienie z plamką w środku (rys. 10). Na nowych, nie szczepionych liściach pojawiają się nekrotyczne plamki, które w miarę rozwoju liścia powiększając się, powodują jego zamieranie.

Powyższy podział oparty jest na obserwacjach, przeprowadzanych nad poszczególnymi rodami, pochodzącymi ze stacji hodowlano-badawczych rejonu pomorskiego, pozostającymi w naszych badaniach od 1947 roku.

Szczep X^{H} stwierdzono w latach 1947—1949 między innymi na rodach 12, 34, 209, 210. Szczep X^{G} wystąpił na rodach 61, 65, 126, 208. Szczep X^{L} wystąpił na rodach 172, 256. Wreszcie objawy charakterystyczne dla szczepu X^{S} wykazały rody: 41/378, 47, 81, 1619.

Wirus Y charakteryzuje się także różnym stopniem zjadliwości. Opanowane wirusem Y ziemniaki w pierwszym roku dają typowe objawy schorzenia, zaznaczające się zczernieniem żyłek na liściach (rys. 4), oraz wystąpieniem brunatnych smug wzdłuż ogonków liściowych i na łodydze.

Rys. 10. Pierwsze objawy zakażenia liścia tytoniu silnie wirulentnymi szczepami wirusa X o słabej koncentracji



Rys. 11. Pierwsze objawy zakażenia liścia tytoniu szczepem S wirusa X o silnej koncentracji

W późniejszym stadium choroby następuje zamieranie dolnych liści, które nie odpadają, zwisają na łodydze i nadają chorej roślinie charakterystyczny wygląd (rys. 11).

Oprócz typowych objawów na niektórych odmianach występują symptomy odmienne określane mianem „smugowatości plamistej". Na opanowanych pędach zjawiają się na liściach małe kanciaste, brunatne plamki, łudząco podobne do plamek wywołanych wystąpieniem grzyba *Alternaria tenuis*. W miarę rozwoju choroby, plamki wydłużają się i podobnie jak przy typowej smugowatości zbiegają wzdłuż nerwów,

ogonków liściowych i łodygi, tworząc brunatne, wgłębione smugi. W następnym roku z chorych bulw wyrastają słabe krzaki, niekiedy całkowicie skarlałe, o liściach zniekształconych, skędzierzawionych, z objawami mozaiki pomarszczonej (rys. 12).

Nasilenie poszczególnych objawów i ich ostrość uzależnione jest od danej odmiany ziemniaków. Podobnie jak w reagowaniu na szczepy wirusa X, tak i tutaj mamy do czynienia z odmianami bardziej lub mniej wrażliwymi na wirusa Y.

Rys 12. Krzak ziemniaka (ród 943) opanowany przez wirus Y

W doświadczeniach naszych najczęściej jednak spotykaliśmy się ze zjawiskiem infekcji mieszanej, powodowanej równocześnie przez wirus X + Y. Opanowane tymi dwoma wirusami ziemniaki wykazują ostre objawy mozaiki, zniekształcenie blaszki liściowej (falistość, wyboistość względnie pomarszczenie), zahamowanie w rozwoju całej rośliny, albo tylko poszczególnych pędów względnie liści. Łącznie z tymi objawami występuje niejednokrotnie także wyraźnie nekroza żyłek.

Omówione poprzednio spostrzeżenia, odnoszące się do wirusa X i Y, oparte są na obserwacjach polowych prowadzonych przez nas systematycznie w trzech różnych stadiach rozwojowych rośliny.

Pierwsze obserwacje przypadają w okresie 5 do 6 tygodni po wysadzeniu, czyli w tym stadium, gdy roślina osiąga 20 cm wzrostu i ma zaledwie 3 względnie 4 pędy. W młodocianym okresie rozwojowym rośliny, zakażenie chorobami wirusowymi najłatwiej następuje i jest też najłatwiejsze do zauważenia. Obserwacje w tym czasie dokonywane mają szczególnie doniosłe znaczenie. W tkankach młodej rośliny białko wirusowe gromadzi się intensywniej, niż w roślinie starszej (D o n c a s t e r i G r e g o r y 1948). Szczepy wirusa X wywołujące słabą mozaikę, dają się uchwycić jedynie w pierwszym okresie rozwoju rośliny, w okresach późniejszych przy wyższej temperaturze powietrza zanikają zupełnie.

Dalsze obserwacje były przeprowadzane w okresie kwitnienia ziemniaków, a więc w lipcu i pierwszej połowie sierpnia, oraz w końcowym okresie wegetacyjnym tzn. z końcem sierpnia i we wrześniu.

W okresie kwitnienia oprócz obserwacji nad zdrowotnością dokonywane były także obserwacje nad ogólnym rozwojem rośliny, przy czym liczono ilość pędów oraz mierzono ich wysokość od podstawy do pączka

Fot. Z. Zwolińska

Rys. 13. Objawy mozaiki pomarszczonej na liściach ziemniaczanych wywołane wirusem Y

szczytowego za pomocą drewnianej miary metrowej. Zwracano również uwagę na dokładny opis pokroju poszczególnych krzaków, podawano czy wielkość ich była normalna, czy też wystąpiło zahamowanie w rozwoju. Przy objawach zahamowania zaznaczono, czy dotyczą one tylko liści czy też następowało zmniejszenie wysokości pojedynczych pędów względnie całych krzaków.

W stadium końcowym rozwoju obserwacje dotyczyły żywotności poszczególnych krzaków, uzależnionej przede wszystkim od schorzeń wirusowych, oraz stopnia zaatakowania roślin chorobami grzybowymi.

5. METODA BIOLOGICZNYCH TESTÓW

Z uwagi na wielką zmienność objawową chorób wirusowych w zależności od odmiany ziemniaków i warunków zewnętrznych, jak już wyżej wspomniano, poza symptomatologią, stosowany jest cały szereg metod dla ustalenia typu schorzenia.

Jedną z metod, ułatwiającą diagnozę jest przenoszenie soku wyciśniętego z badanych liści, łęt czy kiełków ziemniaczanych na rośliny testowe, tj. takie, które w charakterystyczny sposób reagują na infekcję danym wirusem względnie jego szczepem. Stwierdzono bowiem, że poza ziemniakami infekcja wirusowa może się przyjmować na takich roślinach jak *Nicotiana tabacum, Datura stramonium, Capsicum annuum, Petunia* i jeszcze wielu innych z rodziny *Solanaceae* (Smith 1937) oraz *Gomphrena globosa* z rodziny *Amarantaceae*.

Najczęściej stosowanymi roślinami testowymi jest *Nicotiana tabacum* i *Datura stramonium*, przy czym należy podkreślić, że pierwsza jest wrażliwa na wirus X i Y, podczas gdy druga tylko na wirus X.

W wyniku przeszczepiania wirusa X z chorych ziemniaków na tytoń lub bieluń, na roślinach tych, zależnie od szczepu wirusa występują objawy od lekkiej i ledwo spostrzegalnej plamistości, poprzez mozaikę różnej intensywności aż do ciężkiej nekrozy i plamek pierścieniowych (Bawden, Kassanis, Roberts 1948).

Przy zakażaniu tytoniu, jako rośliny testowej, sokiem z ziemniaków opanowanych szczepami wirusa Y, otrzymujemy zawsze te same charakterystyczne objawy: rozjaśnienie nerwów w pierwszym okresie infekcji na najmłodszych liściach i otaśmienie żyłek w późniejszym stadium.

Rośliny testowe odgrywają szczególnie doniosłą rolę w wypadku schorzeń ziemniaków wywołanych równocześnie wirusem X i Y. Dzięki temu, że niektóre z nich są wrażliwe na infekcję tylko jednym składnikiem z kompleksu wirusowego, a odporne względem drugiego, używamy ich jako tak zwanych „filtrów roślinnych". W wypadku infekcji kompleksem wirus X + Y na testowej roślinie tego typu znajdzie się tylko ten wirus, na który ona jest wrażliwa, podczas gdy drugi zostanie jak gdyby „odfiltrowany". W ten sposób otrzymuje się „czyste kultury" odpowiedniego wirusa.

Ze znanych roślin testowych wrażliwymi na wirus X a odpornymi na wirus Y są: *Datura stramonium* i *Solanum dulcamara*. Wrażliwą natomiast tylko na wirus Y jest *Petunia*, która po zaszczepieniu na niej kompleksu wirusowego X + Y daje przy przeszczepieniu na tytoń „czystą kulturę" wirusa Y (Garbowski 1937).

Ostatnio coraz częściej stosowaną rośliną testową jest *Gomphrena globosa*, wrażliwa na wirus liściozwoju i wirus X (Natti i in. 1953), (Raychaudhuri 1953).

W wypadku zakażenia tej rośliny wirusem X, na liściach pojawiają się nekrotyczne pierścienie z plamką w środku o karminowym zabarwieniu. Cechą charakterystyczną jest występowanie objawów tylko na liściach szczepionych, toteż można na jednej roślinie przeprowadzać szczepienie w kilku powtórzeniach.

Köhler (1953) drogą krzyżówki *Solanum demissum* × *S. tuberosum* w odmianie *Aquila*, uzyskał nową roślinę testową, którą nazwał „A6", wrażliwą na schorzenia wirusowe typu mozaik.

Zaszczepione różnymi szczepami wirusa X jednoroczne rośliny tego mieszańca dawały objawy nekrotycznych plamek, różnej wielkości i różnego kształtu. Objawy tak różnorodne nie występowały przy żadnym innym schorzeniu. W wypadku szczepienia roślin dwuletnich tylko pewna ich część wykazywała objawy nekrotycznych plamek, podczas gdy na innych roślinach nie było żadnych symptomów chorobowych. Obraz jednak był zupełnie inny gdy szczepienie było przeprowadzane na dolnej stronie liścia. Po 3 do 5 dniach występowało wtedy sczernienie nerwów.

Przy zakażeniu mieszańca „A6" wirusem Y występowały po 5 do 7 dniach albo od razu nekrotyczne plamki w formie kółek, albo ciemnozielone pierścienie na jaśniejszym tle, które później przechodziły w nekrotyczne plamki. Przy inokulacji rośliny A6 szczepami wirusa Y trudno jest jednak postawić ścisłą diagnozę, gdyż w późniejszym okresie rozwoju choroby symptomy są identyczne z objawami wywołanymi przez wirus A.

Efektywność stosowania metody biologicznych testów zależy od wielu czynników. W pierwszym rzędzie od sposobu wykonania zakażenia, następnie od stanu rośliny i warunków zewnętrznych jak: temperatura, światło i wilgotność. Odnosi się to w szczególności do tych wypadków gdy mamy do czynienia z kompleksem wirusowym i chcemy uzyskać jego rozdzielenie.

Znanych jest kilka metod szczepienia.

Pierwsze próby przeszczepiania polegały na wstrzykiwaniu soku rośliny badanej do rośliny testowej lub nakładaniu kropli soku na liść i drapaniu igłą. Wyniki w ten sposób przeprowadzonego szczepienia dość często dawały wynik negatywny (Bawden 1950).

Lepsze rezultaty dawało rozcieranie w moździerzu zakażonej tkanki i wcieranie wyciśniętego soku palcem, pałeczką lub gazą w górną powierzchnię liścia (rys. 13 i 14). Zakażenie zachodziło wtedy najprawdopodobniej poprzez miejsce zranienia przy pocieraniu. Jednakże o ile zranienie było tak silne, że niszczyło tkankę, zakażenie nie następowało.

Rawlins i Tompkins (1934, 1936) stwierdzili, że przy przenoszeniu chorób wirusowych drogą szczepienia czyli inokulacji najlepsze rezultaty daje użycie karborundu jako materiału ściernego, powodującego zranienia tkanki przy pocieraniu liścia inokulatem.

Rys. 14. Szczepienie siewek tytoniu za pomocą pałeczki porcelanowej

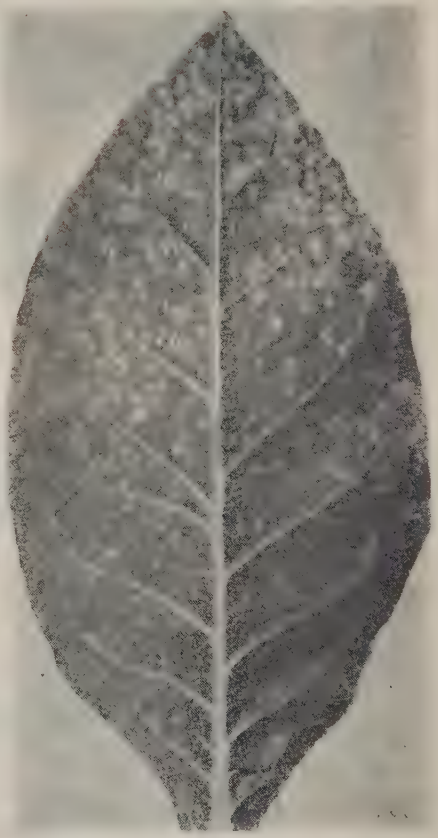
Rys. 15. Szczepienie siewek tytoniu przez wcieranie wyciśniętego soku palcem

Kalmus i Kassanis (1945) na podstawie licznych doświadczeń z różnymi materiałami ściernymi wykazali, że spośród używanych materiałów: węgla drzewnego, węgla zwierzęcego, karborundu, zastosowanie tego ostatniego dało najwyższy procent roślin zakażonych. Zostało to stwierdzone przy szczepieniu wirusem mozaiki tytoniowej

liści *Nicotiana glutinosa*. Przy użyciu karborundu na liściach szczepionych ilość charakterystycznych plamek nekrotycznych (podwójnych koncentrycznych pierścieni z plamką w środku). „local lesions", wzrosła stokrotnie w porównaniu do ich liczby na liściach zakażanych innym materiałem ściernym.

Oczywiście odgrywa tutaj dużą rolę wielkość kryształków karborundu. Optymalna wielkość ich średnicy leży w granicach 0,25—0,20 mm (400—500 mesh) (Costa 1944).

Rys. 16. Objawy wtórne wirulentnych szczepów wirusa X na podstawie części 6 liścia



Rys. 17. Objawy wtórne wirulentnych szczepów wirusa X na 7 i 8 liściu tytoniu

Działanie małych kryształków karborundu polega na tym, że przy pocieraniu, raniąc komórki skórki, nie uszkadzają one równocześnie komórek parenchymy, dając większe możliwości dla wniknięcia wirusa do tkanki. Zranienia te są delikatne i roślina jeszcze przez 3 godziny jest

wrażliwa na zakażenie, podczas gdy przy zbyt silnym zranieniu bez użycia karborundu komórki obumierają bardzo szybko, a martwe tkanki uniemożliwiają przenikanie wirusowych jednostek.

Do szczepienia winny być używane rośliny w wieku młodocianym, gdyż młoda komórka reaguje na inwazję białka wirusowego gwałtowniej niż starsza, ulegając tym samym łatwiej zakażeniu (rys. 13).

Przy użyciu bielunia najlepsze wyniki daje szczepienie na liścieniach. W wypadku użycia tytoniu najbardziej odpowiednimi do szczepienia są rośliny w stadium 4 małych listków.

Szczepienie metodą inokulacji przy użyciu karborundu jako materiału ściernego przeprowadzano w naszych doświadczeniach na 2 liściach: 3 i 4 licząc od podstawy łodygi (rys. 13). Przebieg zakażenia przedstawiał się następująco:

W wypadku silnie wirulentnych szczepów wirusa X^S, X^N pojawiają się już po 4 do 6 dniach na liściach szczepionych pierwsze oznaki zakażenia, w formie małych pierścieni z nekrotyczną plamką w środku (rys. 10). Ilość nekrotycznych plamek stoi w prostym stosunku do koncentracji białka wirusowego w szczepionym soku (rys. 15).

Na rozwijających się liściach nie szczepionych, po kilku dniach (zależnie od pory roku, wiosną wcześniej, w jesieni — później), występują objawy wtórne mniej lub bardziej silnie.

W tym okresie choroby, w wypadku ostrego szczepu wirusa X, można dokładnie prześledzić, na młodocianych roślinach tytoniu, szybkość i sposób rozchodzenia się zakażenia.

Po 6 do 12 dniach od chwili szczepienia na 6 liściu, licząc od podstawy łodygi, następuje rozchodzenie się infekcji od ogonka liściowego w górę blaszki. Niekiedy cała blaszka liścia pokryta jest mozaiką z plamkami nekrotycznymi, przeważnie jednak objawy występują tylko na podstawowej części liścia, podczas gdy górna jego część jest wolna od objawów (rys. 16). Przebadane poszczególne części liścia na obecność wirusa X metodą precypitacji wykazały w górnych jego partiach brak wirusa X.

Należy zaznaczyć, że 5 liść na zakażonej roślinie nie wykazuje z reguły żadnych objawów schorzenia względnie bardzo słabe.

Na następnych w dalszym ciągu rozwijających się młodych liściach objawy schorzenia występują najpierw w partii górnej i stąd rozchodzą się ku podstawie liścia (rys. 17). Na liściach 7 i 8 objawy są najsilniejsze. Na całej blaszce liściowej występuje silna mozaika z nekrotycznymi plamkami (rys. 9), zawartość białka wirusowego, stwierdzona metodą precypitacji, jest w tych liściach najwyższa (tabela).

Tabela 1

Rozcieńczenie surowicy	1 : 5	1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 100	1 : 120	1 : 140	1 : 160	1 : 320
Liście szczepione	+++	+++	++	++	+	+	—	—	—	—
Liście nie szczepione: 5 liść	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6 liść (dolna część)	+++	+++	+++	++	+	+	—	—	—	—
6 liść (górna część)	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7 liść (dolna część)	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	+	—
7 liść (górna część)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	±
8 liść (dolna część)	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	—
8 liść (górna część)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	±
9, 10, 11 liść	+++	++	++	+	—	—	—	—	—	—
12, 13, 14 liść	++	+	±	—	—	—	—	—	—	—

W miarę wyrastania rośliny rozwijające się później liście wykazują również objawy zakażenia, ale dużo słabsze. Ilość nekrotycznych plamek jest wyraźnie mniejsza lub nawet zanikają one zupełnie.

Objawy opisane powyżej utrzymują się o ile temperatura w szklarni nie przekracza 26°C. Powyżej tej temperatury słabną one, a czasem zanikają zupełnie.

W wypadku zakażenia tytoniu szczepem o słabej wirulencji, na liściu szczepionym nie widać żadnych objawów. Pierwsze oznaki choroby pojawiają się dopiero na liściu 6 i dalszych. Sposób rozchodzenia się zakażenia jest identyczny jak przy zakażeniu szczepem silnie wirulentnym. Przy temperaturze w szklarni ponad 20°C objawy słabej mozaiki zanikają.

Inaczej reaguje na zakażenie silnymi szczepami wirusa X *Datura stramonium*. Od momentu ukazania się nekrotycznych plamek na liściach szczepionych, wszystkie liście rozwijające się po inokulacji wykazują w ciągu całego okresu wegetacyjnego jednakowo silne objawy mozaiki z nekrozą.

W wypadku infekcji wywołanej wirusem Y, pierwsze widoczne objawy na tytoniu to rozjaśnienie nerwów, które daje na blaszce liściowej obraz siateczki. Obraz ten występuje na każdym nowowyrastającym liściu, ale tylko w pierwszym jego stadium rozwojowym, gdyż w późniejszym okresie, kiedy blaszka liściowa znacznie się powiększa, objawowość ulega zmianie — wzdłuż nerwów występują ciemno zielone plamy.

Podobnie jak przy zakażeniu wirusem X najsilniejsze objawy, wywołane wirusem Y, występują na liściu 6, 7 i 8. W odróżnieniu jednak od schorzenia wywołanego wirusem X, brak tu tak charakterystycznego przesuwania się objawów, przeciwnie cała blaszka liściowa od najmłodszego stadium rozwoju wykazuje typowe rozjaśnienie żyłek dając obraz siateczki. Stoi to prawdopodobnie w związku z przesuwaniem się wirusa Y rurkami sitkowymi.

Przy porażeniu tytoniu kompleksem X + Y, pierwsze objawy schorzenia ukazują się w formie nekrotycznych plamek na liściach szczepionych w 5 dniu po inokulacji. W 3 dni później na dalszych rozwijających się liściach występuje przejaśnienie nerwów charakterystyczne dla porażenia wirusem Y, a dopiero później po kilku dniach pojawia się na nich nekroza alarmująca już obecność wirusa X.

W wypadku porażenia tytoniu kompleksem X + Y objawy są tak silne i tak duża jest zawartość białka wirusowego w tkankach, że liście nowe są coraz bardziej zahamowane w rozwoju, co w rezultacie doprowadza do bardzo szybkiego obumierania rośliny.

Omówiona wyżej metoda biologicznych testów pozwala nie tylko na określenie jakościowe schorzenia wirusowego, ale na podstawie liczby występujących nekrotycznych plamek „local lesions" na liściach szczepionych, daje także możność ilościowego oznaczenia nasilenia wirusa w danej roślinie. Metoda ta wprowadzona przez H o l m e s'a znalazła szerokie zastosowanie. H o l m e s (1929) wykazał, że ilość nekrotycznych plamek zmienia się z zawartością białka wirusowego w inokulacie. Pocierane nierozcieńczonym sokiem liście rośliny testowej produkowały kilkaset nekrotycznych plamek na pojedynczym liściu, podczas gdy pocierane sokiem rozcieńczonym wodą w stosunku 1 : 1000 produkowały ich tylko 10. Metoda ta dawała jednak wyniki niedokładne, ponieważ ilość nekrotycznych plamek produkowanych przez ten sam inokulat zmieniała się zależnie od sposobu szczepienia i różnicy indywidualnej pomiędzy liśćmi na tej samej roślinie.

By możliwie wykluczyć źródło błędu S a m u e l i B a l d (1933) zakażali połówki tego samego liścia, wykazując jednakowe niemal ich reagowanie na inwazję wirusowego białka. Stosując tak zwaną metodę półliściową można przy użyciu mniejszej ilości roślin otrzymać dokładniejsze rezultaty.

Najprostszą ze stosowanych powszechnie metod półliściowych jest wybranie jednego preparatu wirusowego jako standardu i zakażanie nim połówki każdego liścia, podczas gdy druga połówka służy do szczepienia preparatu badanego. Każdy preparat może być porównywany bezpośrednio ze standardem i pośrednio poprzez standard jeden z drugim.

Youden i Beale (1943) wskazali na konieczność podejścia statystycznego przy ilościowej ocenie występujących na skutek zakażenia nekrotycznych plamek na liściu. Określając zależność między stopniem zakażenia a koncentracją wirusowego białka, różni autorzy w różny sposób wyrażali liczbę nekrotycznych plamek. Jedni transformowali ją na logarytmy, inni wyrażali ją bez transformacji. Metody te oparte są na założeniu, że zmienna wykazuje rozkład normalny, a zmienność jest niezależna od średniej dla populacji.

Sposób najprostszy polega na obliczeniu na podstawie możliwie dużego materiału liściowego ilości nekrotycznych plamek w odniesieniu do jednostki powierzchni np. 100 cm^2. W tym celu określamy powierzchnię liści mnożąc ich długości przez szerokości w miejscach najszerszych i mnożąc przez współczynnik, który w przybliżeniu jest stały dla każdego gatunku. W wypadku liści tytoniu wynosi on 0,7 (Sadasivan 1940).

Analiza dystrybucji częstotliwości nekrotycznych plamek na połówkach liści pewnej ilości roślin pokazuje, że ich błąd średni wzrasta wraz ze wzrastającą średnią. Stąd płynie wniosek, że analizę zmienności i statystyczne testy nie należy stosować do ilości nekrotycznych plamek, dopóki się jej odpowiednio nie przetransformuje.

Odpowiednią transformacją jest równanie:

$$y = \log_{10} (x + c)$$

gdzie x jest liczbą nekrotycznych plamek. c jest danym współczynnikiem w granicach pomiędzy 15 a 80 (Kleczkowski 1950).

A. Kozłowska

6. BADANIE SIEWEK TYTONIU PORAŻONYCH WIRUSEM X I WIRUSEM Y W ŚWIETLE U. V.

Mnożeniu się białka wirusowego w żywej tkance rośliny towarzyszą zmiany samej komórkowej treści. Przejawia się to nie tylko w dwukierunkowej syntezie substancji białkowej, polegającej na tworzeniu obok siebie, z jednej strony normalnego białka cytoplazmatycznego, z drugiej strony białka wirusowego, ale w pojawianiu się w soku komórkowym substancji ubocznych. Jedną z takich substancji, będącej w zdrowej roślinie tytoniu jednym z ogniw pośrednich w następującym po sobie łańcuchu przemian, jest skopoletyna (6-methoxy — 7-hydroxy — 1 : 2 benzopyron) (Best 1944). W zdrowej roślinie występuje ona w ilościach tak małych, że zaledwie wykrywalnych. Ilość jej wydatnie wzrasta wraz z mnożeniem się białka wirusowego w młodych liściach

tytoniu. Skopoletyna silnie fluoryzuje w świetle ultrafioletowym. Dzięki tej właściwości, z chwilą gdy zaczyna się gromadzić w komórkach, może być łatwo wykryta, wskazując pośrednio na gromadzące się równocześnie białko wirusowe.

Wśród roślin należących do rodziny *Solanaceae*, gromadzenie się skopoletyny zachodzi najintensywniej w tytoniu, w roślinie zawierającej alkaloidy, nikotynę, wykazującą również fluorescencje w świetle U. V. W obu jednak wypadkach jakość świecenia jest nieco odmienna. Nikotyna daje w świetle U. V. refleks fioletowoniebieski, gdy skopoletyna fluoryzuje białawym światłem. Ponadto obecność X i Y badana jest zawsze na młodych siewkach tytoniu, u których obecność nikotyny jest jeszcze tak nieznaczna, że w świetle U. V. nie jest w ogóle widoczna.

Badanie świecenia skopoletyny w porażonych wirusem X i Y liściach tytoniu jest metodą pozwalającą po pierwsze na wcześniejsze wykrywanie białka wirusowego w liściach, zanim jeszcze ukażą się gołym okiem widoczne symptomy, po drugie pozwala wykrywać wirusa X w jego nawet na tytoniu bezobjawowej formie (Kozłowska 1950), po trzecie pozwala łatwiej rozróżniać rasy wirusa X między sobą (Eicke, Bode 1947).

SPOSÓB PRZEPROWADZANIA BADAŃ I OBSERWACJI

Obserwacje zjawiska fluorescencji przeprowadzane są przy pomocy lampy kwarcowej, opatrzonej filtrem Wooda. Wygodną w użyciu jest lampa, posiadająca w dole poniżej źródła światła zasłonięta kamerę, pozwalającą na prowadzenie obserwacji w nie zaciemnionym pokoju.

Badaniu poddawane są siewki tytoniu w pierwszym okresie rozwoju, gdy mają rozwiniętych 5 do 6 liści młodocianych, o okrągławym kształcie, posiadających 5 do 6 nerwów bocznych. Wszystkie młodociane liście w tym stadium rozwoju, oglądane po spodniej stronie w świetle U. V., nie wykazują zjawiska fluorescencji. Cała blaszka liściowa jest jednolitej ciemno-czerwonawo-fioletowej barwy. Dopiero w dalszym ciągu rozwijające się liście dojrzałe, wydłużone, ostro zakończone, o licznych nerwach bocznych, osadzone na wyrastającej w górę łodydze, oglądane po spodniej stronie w świetle U. V., wykazują charakterystyczne dla nikotyny niezbyt silne, jasnoniebieskawe przejaśnienia głównych nerwów liścia. Posiadanie przed rozpoczęciem doświadczeń nie fluoryzujących w U. V. liści tytoniu jest ponadto zależne od ważnego czynnika jakim jest hodowanie roślin od momentu wysiewu w ziemi sterylizowanej. Siewki tytoniu wyhodowane w świeżej ziemi inspektowej wykazują zawsze w miejscu zetknięcia z ziemią, na szyi korzeniowej, w świetle U. V. silną fluorescencję. Liście dotykające bądź leżące na ziemi wykazują to samo zjawisko. Hodując siewki tytoniu w ziemi sterylizowanej unikamy tego źródła błędu.

Sterylizacja ziemi inspektowej, przemieszanej z piaskiem najlepiej zachodzi w specjalnie skonstruowanym autoklawie, gdzie umieszczona w metalowych koszach ziemia, podgrzewana do 100°, znajduje się w ciągu około 1/2 godziny pod ciśnieniem 1 1/2 do 2 atmosfer.

Zdrowe liście siewek tytoniu, rosnące w ziemi sterylizowanej, jeśli nawet zostaną zranione przez potarcie karborundem i do ich komórek wprowadzony zostanie sok rośliny zdrowej tego samego lub innego gatunku, nie wykazują świecenia w świetle U. V. Jeśli jednak do zranionego liścia tytoniu wprowadzone zostaną strzępki grzybni, np. zarazy ziemniaczanej *Phytophthora infestans*, to po kilku dniach obserwować można u tych liści w świetle U. V. niezbyt silne, ale jednak wyraźne zjawisko świecenia nerwów głównych i bocznych. Do badań w świetle U. V. brać zatem należy rośliny nie porażone chorobami grzybowymi.

Liście siewek tytoniu bezpośrednio przed szczepieniem naświetlane promieniami U. V. winny być jednolitej fioletowoczerwonej barwy. Szczepienie roztartymi, wyciętymi z bulwy oczkami, kiełkami, oraz liśćmi ziemniaków, dokonywuje się powszechnie przyjętą metodą przez zranienie liści karborundem. Zależnie od szczepu wirusa X, znajdującego się w tkance ziemniaka, od jego sprzężenia z wirusem Y, świecenie w U. V. spodniej strony liści tytoniu daje rozmaite obrazy i rozmaity stopień nasilenia.

SZCZEPY WIRUSA X, DAJĄCE NA LIŚCIACH TYTONIU NEKROTYCZNE PLAMY

Szczepy wirusa X, wywołujące na młodocianych liściach tytoniu nekrotyczne plamy, opisane zostały przez S a l a m a n a (1938) jako szczepy X^S i X^N, a przez Köhlera są wyróżnione pod nazwą Us/s, U_{44}, Us/r, Us/w i Cs/n (Köhler, Ross 1951, 1953). Tworzą one zawsze na liściach szczepionych plamy w kształcie pierścieni, z silniej lub słabiej, zależnie od szczepu, zaznaczoną wewnątrz nekrozą, prowadzącą u szczepów silnie wirulentnych do całkowitego zasychania liścia.

U licznych odmian ziemniaków, uprawianych w warunkach krakowskich, stwierdzona została obecność bardziej lub mniej wirulentnych szczepów wymienionych typów, które w naszych badaniach ujęte zostały pod ogólną nazwą X^s.

Młodociany liść tytoniu zaszczepiony na wiosnę lub w lecie sokiem kiełka lub liści ziemniaka, zawierających szczep X^s, niekiedy na 2, a z reguły na 3 dzień, gdy gołym okiem żadne objawy nie są jeszcze widoczne, wykazuje ostre świecenie nerwu głównego i nerwów bocznych. Czwartego, a z reguły piątego dnia od zaszczepienia, między świecącymi nerwami widoczne są świecące plamki i pierścienie. Zjawiają się one najpierw na spodniej stronie liścia, później gdy świecenie zaczyna być widoczne i na górnej stronie liścia, pierwsze plamki w kształcie

jasnych pierścieni gołym okiem dadzą się zauważyć. W świetle U. V. ilość ich jest z reguły dwukrotnie większa. W 12 dni po zakażeniu, gdy na liściach wewnątrz pierścieni zaczynają się pojawiać ciemne nekrotyczne plamy, intensywność świecenia nerwów liściowych i jasnych

Rys. 18. Liść tytoniu zakażony szczepem S wirusa X oglądany w świetle UV (strona prawa) i w świetle normalnym (strona lewa)

obręczy wokół nekrotycznych plam dochodzi do optimum (rys. 18). W miarę postępującej nekrozy intensywność świecenia w świetle U. V. słabnie.

SZCZEPY WIRUSA X, DAJĄCE NA LIŚCIACH TYTONIU OBJAWY MOZAIKI

Szczepy wirusa X, nie powodujące na młodocianych liściach tytoniu zamierania komórek, jedynie objawy silniejszej bądź słabszej mozaiki, często trafiające się u naszych odmian ziemniaków, zostały przez nas zakwalifikowane do silnie wirulentnego szczepu X^L i dającego słabsze objawy X^G S a l a m a n a (1938).

Podobnie jak w wypadku szczepów powodujących nekrozę, świecenie nerwu głównego i bocznych w świetle U. V. występuje w wypadku obu wymienionych szczepów znacznie przed ukazaniem się gołym okiem widocznych symptomów. Często już na drugi dzień po zaszczepieniu, w miejscu potarcia występuje świecenie. Na trzeci i czwarty dzień nerw główny i niektóre boczne świecą szczególnie wyraźnie w partiach nasadowych, najszerszych.

Dwa do trzech tygodni od momentu szczepienia, gdy na liściach zjawia się wyraźna bądź słabiej zaznaczona mozaika, świecenie nerwów jest stosunkowo najintensywniejsze. Niekiedy miejsce pokryte mozaiką daje na całej powierzchni niebieskawy refleks. W miarę wzrostu i starzenia się liścia zjawisko świecenia w świetle U. V. słabnie.

SZCZEPY WIRUSA X UTAJONE, NIE DAJĄCE NA MŁODOCIANYCH LIŚCIACH TYTONIU OBJAWÓW

Sok wyciśnięty z zupełnie zdrowo wyglądających, normalnie rozwiniętych ziemniaków, nie dający po przeszczepieniu na młodocianych liściach tytoniu żadnych widocznych objawów, wywołuje jednak na tych ostatnich niekiedy zjawisko niezbyt intensywnego, ale jednak wyraźnego świecenia w świetle U. V. Tytoń taki badany surowicą anti virus X metodą serologiczną odchylenia dopełniacza, wykazuje obecność wirusowego białka. Ten bezobjawowy szczep wirusa X, dający jedynie na pieprzu *Capsicum annuum* delikatną mozaikę, opisany przez Salamana jako szczep H (1938) został przez nas stwierdzony w ziemniakach krakowskich w latach 1948—1951.

Młodociane liście tytoniu w dwa tygodnie po zakażeniu szczepem H wirusa X wykazują zjawisko świecenia w świetle U. V. w rozmaitym nasileniu. Nie występuje ono przy tym w jednakowym czasie. Fluorescencja zjawić się może na drugi dzień po zakażeniu lub dopiero po 6 i więcej dniach. Liść szczepiony może wykazywać słabe świecenie tylko w miejscu szczepienia, bądź nerwy liścia mogą mieć słaby niebieskawy refleks, lub wyraźne białawo świecące przejaśnienia. Świecenie to może być widoczne na całej długości nerwów, bądź może występować w krótkich pojedynczych odcinkach (rys. 19).

Rys. 19. Liść tytoniu zakażony bezobjawowym szczepem H wirusa X oglądany w świetle UV (strona prawa), w świetle normalnym (strona lewa)

WIRUS SMUGOWATOŚCI Y

Daje on na młodocianych liściach tytoniu około 2 tygodnie po zaszczepieniu zarażonym sokiem charakterystyczne, gołym okiem widoczne przejaśnienia nerwów i drobnych żyłek liścia. W świetle U. V.

liście takie wykazują szczególnie silną fluorescencję: nerwy główne i ich drobne rozgałęzienia przedstawiają białawo świecącą siatkę. Świecenie poprzedzają gołym okiem widoczne symptomy. W wypadku sprzężenia wirusa Y z nekrotycznym szczepem wirusa X, fluorescencja jeszcze się bardziej potęguje.

W późniejszym stadium rozwoju choroby, gdy ustępuje przejaśnienie nerwów, a zjawiają się wzdłuż wiązek sitowo-naczyniowych zielone smugi nagromadzonych chloroplastów, fluorescencja w świetle U. V. nie występuje zupełnie.

Z. Maj

7. METODY SEROLOGICZNE BADANIA WIRUSA X W ZIEMNIAKACH

Dla przeprowadzenia badań metodami serologicznymi konieczne jest otrzymanie wyciągów białkowych z roślin porażonych badaną chorobą wirusową, w naszym wypadku wirusem X, i dla doświadczeń kontrolnych wyciągu z roślin zdrowych.

Wydajność wirusa X, jak wykazały doświadczenia jest największa w siewkach tytoniu, wynosić ona może około 100 mg na 1 litr wyciśniętego soku (Markham, Smith 1954).

A. OTRZYMYWANIE EKSTRAKTÓW BIAŁKOWYCH ZE ZDROWYCH ROŚLIN TYTONIU

Ekstrakty białkowe dla badań serologicznych, służące w pierwszym rzędzie do otrzymywania surowic, winny być w stanie rozpuszczalnym, niezdenaturowanym. Przebieg i wyniki metod stosowanych przy otrzymywaniu możliwie nie zmienionych substancji białkowych podają między innymi Bawden, Pirie (1938), Kozłowska (1947), wreszcie Pirie (1950).

Według tych autorów z liści tytoniu pozbawionych nerwów natychmiast po zerwaniu zmielonych nierdzewną maszynką, bądź homogenizatorem (Waring blendor), wyciskany był sok do naczynia ochładzanego lodem. Następnie skrobia i części nierozpuszczalne były usuwane bądź ultracentryfugą o 40 000 obr./min., bądź zwykłym wirowaniem przy 3000 obr./min. po uprzednim podgrzaniu ekstraktu do 60° C lub dodaniu do niego Na_2HPO_4. Osady były kilkakrotnie płukane przy pH = 6. Okazało się, że mimo płukania część nukleoprotein pozostaje w osadach, tym samym ilość białek w soku liści nie jest stała. Przez powtórne kilkakrotnie powtarzane mielenie wytłoków, stosując do eks-

trakcji wodę destylowaną zalkalizowaną 0,2 n NaOH do pH = 8, uzyskiwał Bawden i Crook (1947) przechodzenie znacznego procentu zaadsorbowanych białek liści tytoniu do roztworu.

Białko w pozostałym odsączu było następnie wytrącane bądź, najczęściej do wytrącania białek stosowanym, siarczanem amonu, bądź doprowadzaniem roztworu do punktu izoelektrycznego przy pomocy CCl_3COOH.

Według Pirie (1950) zamrażanie liści bezpośrednio po zerwaniu wpływa na zmniejszenie ilości otrzymanego białka.

Zawartość substancji białkowych w liściach tytoniu jest w wysokim stopniu zależna od wieku i rozwoju liści. Wyniki doświadczeń przeprowadzonych z liśćmi rozmaitego wieku ilustruje poniższa tabela (Pirie 1950).

Długość liści	Średnia waga liści świeżych	Substancje białkowe w stosunku do litra soku : w gramach
poniżej 16 cm	1,2	1,1
16—21 cm	4,0	1,5
22—26 cm	5,5	1,2
26—30 cm	7,0	1,45
powyżej 30 cm	8,8	1,19

Ponieważ wytrącanie $(NH_4)_2SO_4$ powoduje częściowo przechodzenie części protein w stan nierozpuszczalny, co może być zmniejszone jedynie bardzo szybkim przebiegiem reakcji w niskiej temperaturze, ponadto dla usunięcia siarczanu amonu konieczne jest stosowanie dializy, która też przeprowadza częściowo białka w stan nierozpuszczalny, w doświadczeniach naszych przyjęliśmy uproszczoną metodę zasadniczego wytrącania białek z soków liści kwasem trójchlorooctowym.

Sprawą pierwszorzędnego znaczenia jest użycie do ekstrakcji substancji białkowych, liści tytoniu w możliwie wczesnym stadium rozwoju, gdy wydajność tych substancji jest największa a czyszczenie najłatwiejsze.

Hodowla szklarniowa tytoniu była prowadzona od lutego do końca października. Miesiące zimowe na ogół nie sprzyjają normalnemu wzrostowi roślin, nie dając dostatecznie dużej masy. Tytoń po wzejściu i przepikowaniu, przesadzony do doniczek, w ciągu około 4—6 tygodni znajduje się w młodocianym stadium rozwoju. Pierwszych 5—6 liści tworzących przyziemną rozetę, ma kształt owalny nieznacznie dłuższy niż szerszy, nerwy boczne nieliczne od 6—7. W okresie najbujniejszego rozwoju liście młodociane dochodzą do 20 cm długości. Z chwilą gdy łodyga zaczyna się wydłużać i zjawiają się na niej liście dojrzałe o wydłużonym, ostro zakończonym kształcie z licznymi nerwami bocznymi, liście młodociane żółknąc, kończą stopniowo swój okres rozwojowy.

W porównaniu z liśćmi dojrzałymi z liści młodocianych tytoniu, białko najłatwiej daje się ekstrahować, przechodząc pod wpływem kwasu trójchlorooctowego w małym tylko procencie w stan nierozpuszczalny.

Zerwane liście młodociane możliwie natychmiast były miażdżone z niewielką ilością wody destylowanej w elektrycznym młynku, homogenizatorze, tak by rozerwanie tkanki było możliwie dokładne. Wytłoki były płukane kilkakrotnie wodą destylowaną zalkalizowaną 0,2 n NaOH do pH = 8. Przekroczenie pH 8 może doprowadzić do częściowej denaturacji protein. Wyciśnięty z miazgi wraz z białkiem wyługowanym z wytłoków sok był wstawiany do łaźni wodnej o temperaturze nie przekraczającej 55° C. W tej temperaturze w stale mieszanym soku wytrąca się po 10 min. chlorofil, który zostaje odwirowany przy 3000 obr./min. Do klarownego odsączu o jasno-słomkowym zabarwieniu, dającego wyraźną reakcję na białko (próba Millona i próba Esbacha), dodawany był kroplami 20% CCl_3COOH. Odsącz był cały czas mieszany dopóki nie zjawiły się wyraźne kłaczki wytrąconego białka w punkcie izoelektrycznym pH = ± 4. Otrzymana pierwsza frakcja białka była następnie odwirowywana w ciągu 20 minut przy 3000 obr./min. W pozostałym odsączu znajdowała się jeszcze pewna niewielka ilość białek izostabilnych, których obecność była wykrywalna przy pomocy odczynnika Esbacha i Millona. Dodanie soli kuchennej w ilości 80 g na 1 litr płynu powoduje po kilku godzinach wytrącenie niewielkiej ilości substancji białkowych. Proces ten można znacznie przyspieszyć przez ogrzanie płynu w łaźni wodnej o temperaturze 37° C. Wydajność substancji białkowych w przeliczeniu na suchą masę wynosi dla frakcji I — 0,38%, dla frakcji II — 0,14%.

Oba osady rozpuszczają się niemal całkowicie w wodzie destylowanej doprowadzonej 0,1 n NaOH do pH = 7. Po odwirowaniu części nierozpuszczalnych, oba połączone razem odsącze mogą być użyte do szczepienia królików w celu otrzymania surowicy swoistej dla zdrowego białka tytoniu

B. OTRZYMYWANIE BIAŁKA WIRUSOWEGO Z PORAŻONYCH WIRUSEM X LIŚCI TYTONIU

Materiałem wyjściowym dla otrzymania wirusa X jest tkanka ziemniaka, w której ten ostatni występuje często razem z wirusem Y. Celem wyodrębnienia wirusa X, należy szczepić sokiem ziemniaków młode siewki bielunia *Datura stramonium* o 5—6 rozwiniętych liściach. Gatunek ten jest w stosunku do wirusa smugowatości Y odporny (S a l a m a n 1938).

Liście bielunia z wyraźnymi objawami wirusa X (wyraźna mozaika i nekrotyczne plamki na liściach), roztarte, używane były do szczepienia liści młodocianych siewek tytoniu.

Ponieważ w porównaniu z ziemniakami i bieluniem wydajność białka wirusowego z tytoniu jest większa, ponadto czyszczenie białka wirusowego z młodych tytoni jest łatwiejsze, te ostatnie są najczęściej wyjściowym materiałem dla otrzymania białkowych ekstraktów zawierających wirusa X. Ważnym ponadto metodycznie zagadnieniem jest ustalenie w jakim stadium rozwoju choroby i jakie szczepy wirusa X powodują największe nagromadzenie białka wirusowego w tkankach.

Liczne szczepy wirusa X, dające objawy na tytoniu, dadzą się podzielić na dwa zasadnicze typy objawów: 1) silniejszą lub słabszą mozaikę i 2) zamieranie miejscami komórek, powodujące nekrozę, często w kształcie charakterystycznych pierścieni. Oba typy wśród naszych ziemniaczanych upraw dość często się zdarzają.

Według S a l a m a n a (1938) objawy wirusa X na tytoniu w formie pierścieni z nekrotycznymi plamami po środku, oraz tworzące charakterystyczną szylkretową strukturę zawierają z reguły kilka różnych razem występujących szczepów. Metodą najłatwiejszą pozwalającą określić ilościowo całkowite stężenie białka wirusowego w tkance, niezależnie od jakości szczepu, jest metoda serologiczna precypitacji względnie odchylenia dopełniacza.

B a w d e n (1950) stwierdza, że między ostrymi symptomami na tytoniu a mianem precypitacji, odpowiadającym całkowitemu stężeniu białka wirusowego nie zawsze istnieje zgodność.

M a t t h e w s (1949) natomiast badając metodą precypitacji 10 wyodrębnionych szczepów wirusa X, wykazał różne nasilenie białka wirusowego w liściach tytoniu zależnie od bardziej lub mniej wirulentnego szczepu. Szczepy dające na liściu zaszczepionym nekrotyczne względnie chlorotyczne plamy a na dalszych liściach pierścienie z nekrozą, dawały najwyższe miana precypitacji 1 : 512, 1 : 256. Szczepy dające podobnie na liściach nekrotyczne i chlorotyczne plamy a na dalszych liściach nieszczepionych słabsze objawy i szyldkretową strukturę, dawały miano 1 : 64, wreszcie szczepy dające na dalszych nieszczepionych liściach mozaikę o rozmaitym nasileniu, do zupełnego braku jakichkolwiek objawów 1 : 32 do 1 : 16.

K a n n g i e s s e r i D e u b n e r (1954), badając w mikroskopie elektronowym szczep wirusa X, dający na ziemniakach odmiany Erstling mozaikę, a na tytoniu silną pierścieniową nekrozę, otrzymali obraz wskazujący na bardzo dużą koncentrację jednostek wirusowych w kropli soku.

Wydajność wirusa X u tytoniu jest zależna nie tylko od szczepu, ale w bardzo dużym stopniu od pory roku, od wieku liści, od czasu jaki upłynął od momentu szczepienia, wreszcie nawet od kolejności ustawienia liści na łodydze (B e r k s 1954).

W naszych kilkuletnich doświadczeniach największa wydajność białka wirusa X była osiągana z młodocianych liści tytoniu, mających objawy

w postaci pierścieniowej nekrozy i szyldkretowej struktury. Wykazuje to następujące doświadczenie:

Roztartym liściem *Datura stramonium*, mającym objawy nekrotyczne, szczepiony był 2 i 3 rozwijający się liść młodociany długości od 5 do 10 cm. Po 5, względnie w niekorzystnych warunkach po 7 dniach, zjawiały się na tych liściach nekrotyczne plamki. Liście takie badane metodą precypitacji opisaną poniżej, dawały w wypadku metody kroplowej, przy użyciu surowicy 1 : 1, ślady tworzących się kłaczków (± do —) a w metodzie probówkowej przy rozcieńczeniu surowicy, ledwie zaznaczający się osad.

Sok tych samych liści badanych kilka dni później, nieznacznie tylko zwiększył miano precypitacji.

Kolejno na łodydze wyrastające liście dają niejednakowe nasilenia precypitacji. Liść bezpośrednio wyrastający po liściach zaszczepionych, nie wykazujący żadnych objawów zewnętrznych, nie daje w ogóle pozytywnej precypitacji. Dopiero liście następne, na których po 14 dniach względnie w niekorzystnych warunkach po 19 dniach od zaszczepienia występują wyraźne objawy pierścieniowej nekrozy względnie silnej mozaiki i szyldkretowej struktury, dają silną pozytywną precypitację w postaci dużych, kłaczkowatych skupień wytrąconego białka, zarówno w metodzie kroplowej jak i probówkowej. Liście młodociane w czasie wyrastania łodygi i liści dojrzałych, żółknąc wykazują wyraźny spadek miana precypitacji. W porównaniu z liśćmi młodocianymi, później rozwijające się liście dojrzałe, mające słabsze objawy, dają równocześnie słabszą precypitację.

Nasilenie precypitacji w zależności od rozwoju choroby na kolejnych liściach tytoniu przedstawia załączona tabela.

Nr probówki	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Rozcieńczenie surowicy	1 : 5	1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 160	1 : 320	1 : 640	1 : 1280
Liście zdrowe	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Liście szczepione	+++	+++	++	++	+	—	—	—	—
Liście z objawami wtórnymi (młodociane)	+++	+++	+++	++	++	+	—	—	—
Liście z objawami wtórnymi (dojrzałe)	+++	++	++	+	±	—	—	—	—

± — bardzo słaba precypitacja,
\+ — słaba precypitacja
\+ + — silna precypitacja,
\+ + + — bardzo silna precypitacja.

Na podstawie tych obserwacji i badań, uważając precypitację za niewątpliwy wskaźnik ilości białka wirusowego w roślinie, uznaliśmy liście młodociane siewek tytoniu z wtórnymi objawami nekrozy, sil-

nej mozaiki i szyldkretowej struktury w ich pełnym okresie rozwoju, za najlepiej nadające się do ekstrakcji białka wirusa X.

Wielu badaczy stosuje metodę zamrażania liści celem łatwiejszego późniejszego czyszczenia. Jednak według Bawden, Pirie (1938) i Bawden, Crook'a (1947), mrożenie liści tytoniu przed ich miażdżeniem wydatnie zmniejsza ilość rozpuszczalnego białka. Proteiny ulegają częściowej denaturacji, pozostając w nierozpuszczalnych wytłokach. Z mrożonych przed miażdżeniem liści tytoniu przechodziło do roztworu 12% N, podczas gdy z liści branych w stanie świeżym 17% N.

W doświadczeniach naszych, porażone wirusem X młodociane liście tytoniu, podobnie jak w wypadku liści zdrowych, w stanie świeżym natychmiast po zerwaniu były miażdżone w homogenizatorze z niewielkim dodatkiem wody destylowanej umożliwiającej działanie młynka. Mielenie trwające 3—4 min. przy stosowaniu możliwie dużej ilości obrotów na minutę, dawało miazgę liściową, która oglądana pod mikroskopem wykazywała mały procent komórek nienaruszonych.

Po wyciśnięciu z miazgi soku przez płócienny worek pod prasą, pozostałe wytłoki, zawierały znaczny procent zaadsorbowanego białka wirusowego. Wyługowanie wytłoków lekko zalkalizowaną wodą destylowaną, stosowane przy ekstrakcji białka zdrowego nie doprowadza do zupełnego uwolnienia białka wirusowego z pozostałych części roślinnych. Wirus X występujący pod postacią długich krystalicznych nitek, raz zaadsorbowany na częściach nierozpuszczalnych komórki niezmiernie trudno przechodzi do roztworu.

Bawden i Crook (1947) działając enzymami ślimaka na wytłoki liści tytoniu przeprowadzali do roztworu częściowo zaadsorbowane w wytłokach białko wirusa X. Okazało się, że stanowiło ono około połowy ogólnej zawartości wirusa X w liściu. Jest interesujące, że białko wirusa X zawarte w soku i zawarte w wytłokach różniło się nieco własnościami serologicznymi, dając inny obraz precypitacji. Przy otrzymywaniu jednak białka wirusowego dla celów serologicznych zazwyczaj nie uwzględnia się owej wytłokowej frakcji.

Otrzymany przez wyciśnięcie miazgi liściowej i kilkakrotne płukanie wytłoków wodą destylowaną zalkalizowaną 0,2 n. NaOH do pH = 8, zielony sok był poddawany dalszemu badaniu. Dodawanie przy wyciskaniu i ługowaniu soków ze zmiażdżonych liści buforów względnie małych nawet ilości soli obniża rozpuszczalność protein.

Dalszym etapem czyszczenia było oddzielenie chloroplastów z zielonego soku. Najłatwiejszą w użyciu jest metoda podgrzewania opisana przy ekstrakcji normalnych protein ze zdrowych liści. Do łaźni wodnej o temperaturze 55° C wstawiamy naczynie z wyciśniętym sokiem, w którym po 10 minutach następuje wytrącenie chlorofilu.

Sok odwirowany przy 3000 obr./min jest barwy słomkowej, lekko opalizujący.

Bawden, Pirie (1938) ekstrahując po raz pierwszy wirusa X metodami chemicznymi uzyskiwali całkowite wytrącenie go z soku siarczanem amonu przy 1/4 nasycenia (185 g na 1 litr). Dalsze czyszczenie polegało na rozpuszczaniu osadu w wodzie zalkalizowanej a następnie wytrącanie go przez doprowadzenie płynu do punktu izoelektrycznego (pH = ± 4). Okazuje się jednak, że kilkakrotne wytrącanie białka wirusa X z roztworu prowadzi do częściowej lub często całkowitej jego denaturacji. Zjawisko to jest spowodowane tworzeniem przez wirusa X agregatów, polegających na łączeniu się nitkowatych jednostek w wydłużone nici, dające w obrazie mikroskopu elektronowego splątaną sieć, która nie przechodzi do rozwtoru (Kanngiesser, Deubner 1954). Łatwo rozpuszczalne krystaliczne, pojedyncze jednostki wirusa X, oglądane były w mikroskopie elektronowym w świeżym soku, bądź przy stosowaniu jednorazowego jedynie wytrącenia wirusowego białka.

Zaznaczyć ponadto należy, że dializowanie płynów celem oddzielenia $(NH_4)_2SO_4$ przeprowadza również białko wirusa X w stan nierozpuszczalny.

Zgodnie z pracami Takahashi, Rawlins'a (1946) i Pirie (1950) w doświadczeniach naszych stosowana była metoda najprostsza wytrącania białka wirusa X jednorazowo, kwasem trójchlorooctowym. Do opalizującego, pozbawionego chlorofilu odsączu dodawany był 20% CCl_3COOH kroplami do momentu ukazania się pierwszych kłaczków białka. Punkt izoelektryczny protein normalnych i wirusowych waha się w tych samych granicach ± 4 pH, oba też rodzaje protein przechodzą do osadu. Osad odwirowywany był przy 3000 obr./min., a następnie rozpuszczany w możliwie małej ilości wody destylowanej zalkalizowanej 0,1 n NaOH do pH powyżej 7. Osad w ten sposób otrzymany łatwo przechodzi do roztworu. Części nierozpuszczalne usuwane są wirowaniem przy 3000 obr./min. Opalizujący odsącz o brunatnym zabarwieniu zawiera substancje białkowe wykrywalne odczynnikiem Esbacha i Millona. Wydajność tak otrzymanych nieoczyszczonych protein z porażonych wirusem X liści tytoniu wynosiła w stosunku do suchej masy liści 1,055%. Frakcja ta przedstawiała substancje białkowe w stanie nieoczyszczonym tak, że procent azotu w nich zawarty nie przekracza 10,8.

Liście *Datura stramonium* porażone ostrymi szczepami wirusa X^n i X^s, wykazujące na liściach nekrotyczne plamy, były również używane do otrzymywania ekstraktów białkowych wyżej opisaną metodą. Po wytrąceniu kwasem trójchlorooctowym osad w znacznie mniejszym stopniu, niż w wypadku tytoniu rozpuszczał się w słabo zalkalizowanej wodzie. Wydajność całkowita nieoczyszczonych substancji białkowych, wytrąconych CCl_3COOH była mniejsza niż u tytoniu i wynosiła około 0,7% w stosunku do suchej masy liścia.

Obecność w ekstrakcie białka wirusa X może być stwierdzona na drodze biologicznej, serologicznej, wreszcie fizyko-chemicznej.

Szczepiąc siewki tytoniu w ten sposób otrzymanym ekstraktem występują zawsze na liściach młodocianych objawy charakterystyczne dla szczepów N i S wirusa X. Z surowicą antiwirus X ekstrakt daje silną precypitację. Wreszcie obecność wirusa X może być wykryta obserwowaniem w polaryzacyjnym mikroskopie zjawiska podwójnego załamania w prądzie (B a w d e n 1938).

Sprawą istotną dla badań wirusologicznych w szczególności serologicznych jest otrzymywanie wirusów w stanie możliwie oczyszczonym. Budowa jednostek wirusa X poznana w mikroskopie elektronowym i związana z tym ich zdolność adsorbcji sprawia, że oddzielenie go od normalnych białek komórki napotyka na duże trudności.

Ekstrakt otrzymany przez nas przy pomocy CCl_3COOH zawierał zawsze zarówno białko wirusowe jak i cytoplazmatyczne.

Otrzymany sok z porażonych wirusem X liści tytoniu, w rozmaitym stadium rozwoju (młodocianych i dojrzałych), dawał zawsze wyraźną precypitację, zarówno z surowicą antiwirus X, jak i surowicą przeciw substancjom białkowym, otrzymanym ze zdrowych liści tytoniu. Nawet liście młodociane pożółkłe, kończące okres wegetacji, zawierające niski procent azotu całkowitego, dochodzącego do 1,96%, dawały w ekstrakcie białkowym zawsze pozytywną precypitację z obydwoma rodzajami surowic.

Metoda oddzielenia białka zdrowego przy użyciu enzymów ślimaka jest metodycznie trudna (B a w d e n, C r o o k 1947).

W doświadczeniach naszych udało się otrzymać na drodze chemicznej jedną z frakcji wirusa X całkowicie niemal wolną od białek normalnych cytoplazmatycznych. W odsączu, pozostałym po odwirowaniu pierwszej frakcji białka wytrąconego kwasem trójchlorooctowym, pozostaje jeszcze spora ilość białek izostabilnych, które wytrącają się po kilku godzinach po dodaniu 80 g soli kuchennej na 1 litr odsączu. Wytrącanie to można znacznie przyspieszyć przez podgrzanie płynu w łaźni wodnej o temperaturze 37° C. Białko to było odwirowywane i rozpuszczało się niemal całkowicie w wodzie zalkalizowanej do pH = 7. Badane metodą precypitacji pod mikroskopem na szkiełku przedmiotowym dało z surowicą antiwirus X bardzo silną precypitację, natomiast z surowicą przeciw zdrowemu białku precypitacja była zaledwie widoczna. Frakcja ta użyta do szczepienia siewek tytoniu powodowała na tych ostatnich typowe objawy ostrych szczepów wirusa X.

Ilość tą drogą otrzymanych substancji białkowych z decydującą przewagą, jak to wykazała precypitacja, białka wirusowego w stosunku do śladów zaledwie białka zdrowego, jest bardzo mała.

C. OTRZYMYWANIE SWOISTYCH SUROWIC

Substancje białkowe, wstrzykiwane dożylnie zwierzęciu, wywołujące powstanie w surowicy swoistych przeciwciał noszą nazwę antygenów.

Dworak (1927) stwierdził po raz pierwszy, że sok pochodzący z ziemniaków, wykazujących objawy mozaiki, ma odrębne własności antygenowe niż sok pochodzący ze zdrowych roślin.

Chester (1935) studiując własności serologiczne licznych ras mozaiki tytoniowej i ziemniaczanego wirusa X, doszedł do wniosku, że reakcja serologiczna może być podstawą wyróżniania i klasyfikacji wirusów roślinnych. Według Chester'a (1936) metodami serologicznymi można poszczególne szczepy wirusa X wyróżnić.

Spooner i Bawden (1935) wykazali, że *Nicotiana tabacum, N. glutinosa, Datura stramonium i Solanum tuberosum*, zakażone wirusem ziemniaczanym X, wytwarzają wspólne antygeny i że własności antygenowe wirusa zakażającego roślinę są stałe i niezależne od gospodarza.

Newton i Edwards (1936) podkreślają ważność metod serologicznych dla identyfikowania wirusów roślinnych. Autorzy ci wykazali, że pomidory, wykazujące rozmaite objawy, jak również ziemniaki z objawami mozaiki dają reakcję z surowicą anti X.

Używanie jako antygenu surowego soku roślinnego może być stosowane jedynie wówczas, gdy mamy pewność, że sok ten nie działa toksycznie na organizm zwierzęcia. Ponieważ w wypadku wirusa X mamy do czynienia wyłącznie z roślinami z rodziny *Solanaceae*, zawierającymi trujące alkaloidy, sposób ten nie może być stosowany. Dla otrzymania surowic używane są wyłącznie wyciągi białkowe otrzymywane wyżej opisanymi metodami.

Ekstrakty białkowe otrzymywane z liści, rozpuszczane w możliwie małej ilości zalkalizowanej wody, były wstrzykiwane królikowi do żyły obwodowej ucha. Wstrzykiwanie było powtarzane 6—8 razy wzrastającymi dawkami antygenu od 1 ccm, 2 ccm, 3 ccm, 4 ccm, z przerwami 2- do 5-dniowymi w zależności od wahania się wagi zwierzęcia. Szczególnie aktywne surowice można otrzymać przez seryjne wstrzykiwanie zwierzęciu danego antygenu. Po pierwszej serii zastrzyków stosowana była niekiedy kilkumiesięczna przerwa, po czym zwierzę było powtórnie szczepione. Sposób ten zastosowany w stosunku do normalnego białka tytoniu nie daje pożądanych rezultatów. Po 10 dniach od ostatniego zastrzyku pobierana była niewielka ilość krwi z żyły usznej w celu skontrolowania aktywności surowicy przy pomocy próbnej precypitacji. Jeśli miano surowicy było wystarczające, królik był skrwawiany po uprzednim głodzeniu przez 10—15 godzin.

Uśpionemu eterem zwierzęciu przecina się tętnicę szyjną zbierając krew do sterylnej erlenmajerki. Po utworzeniu się skrzepu od-

dzielamy go za pomocą szklanego pręcika od ścian naczynia i pozostawiamy w chłodnym i ciemnym miejscu do następnego dnia. Wydzieloną surowicę odwirowujemy następnie przy 3000 obr./min.

Otrzymywanie surowicy musi być przeprowadzone w warunkach aseptycznych (w świetle lampy kwarcowej). Do surowicy dodajemy bądź kwasu karbolowego w ilości 1 ml 5% roztworu na 9 ml surowicy, bądź 1—2% suchego kwasu borowego. Surowice są przechowywane w zatopionych ampułkach w temperaturze 0°C.

Zdolność do wytwarzania przeciwciał w surowicy krwi jest u rozmaitych antygenów różna. Białko otrzymane z liści zdrowego tytoniu ma stosunkowo słabe własności antygenowe. Po dożylnym wprowadzeniu królikowi 100 mg proteiny ze zdrowych liści (10—20 mg każdorazowo), miano surowicy wynosi zaledwie 1 : 80 to znaczy że najwyższym rozcieńczeniem surowicy, w którym po zmieszaniu jej z antygenem występują wyraźne strąty, jest rozcieńczenie 1 : 80 (na 1 cm surowicy przypada 79 ccm roztworu fizjologicznego NaCl — P i r i e 1950) Niestałość nukleoprotein cytoplazmatycznych być może powoduje ich rozkład w krwi królika zanim wytworzą się jeszcze przeciwciała. Możliwym jest również rozkład antygenu podczas przebiegu samej reakcji serologicznej. Niejednokrotnie króliki szczepione ekstraktem białkowym otrzymywanym wyżej podaną metodą ze zdrowych liści tytoniu i zdrowych bulw ziemniaka, nie wytwarzają w surowicy dostatecznej ilości przeciwciał, dających się stwierdzić metodą precypitacji. W tych wypadkach jedynie czułą serologiczną metodą wiązania dopełniacza, można stwierdzić zmiany jakie pod wpływem tych antygenów zaszły w surowicy krwi.

Nukleoproteiny wirusowe odznaczają się znacznie silniejszymi własnościami antygenowymi w porównaniu z normalnym białkiem cytoplazmatycznym. Surowica królika szczepionego wyciągiem białkowym otrzymanym z porażonych wirusem X liści tytoniu, zawierającym obok nukleoproteinu wirusowego normalne białko cytoplazmatyczne, daje pozytywną reakcję serologiczną precypitacji z wyciągiem białkowym z liści chorych, a nie daje jej z ekstraktem białkowym tytoni zdrowych. Jedynie w wypadku zastosowania czułej metody reakcji wiązania dopełniacza, obecność zdrowego białka zarówno w antygenach jak i odpowiednich przeciwciał w surowicy powoduje wyraźne zahamowania hemolizy krwinek.

Metodę usuwania z wirusowych wyciągów białkowych normalnego białka cytoplazmatycznego opisują D u n i n i P o p o w a (1938). Według tej metody surowicą przeciw zdrowemu białku wytrąca się z wirusowych wyciągów białkowych normalne proteiny cytoplazmatyczne, powstały osad usuwa się przez odwirowanie, a pozostałym odsączem szczepi się króliki. Otrzymana w ten sposób surowica pozbawiona jest

antyciał przeciw normalnym proteinom roślinnym i może być z powodzeniem stosowana do czułej reakcji wiązania dopełniacza.

Można również z powodzeniem stosować metodę usuwania antyciał przeciw zdrowemu białku z surowicy metodą opisaną przez Bawdena (1950). Według tej metody surowicę przeciwwirusową zawierającą antyciała przeciw zdrowemu białku miesza się z 2—5-krotną ilością oczyszczonego z chlorofilu soku wyciśniętego ze zdrowej rośliny i pozostawia na kilkanaście godzin, po czym wytrącony osad oddziela się przez wirowanie Taką adsorbcję należy powtarzać tak długo dopóki płyn nie przestanie reagować z sokiem zdrowej rośliny. Wytrącanie takie powtarza się każdorazowo przed wykonaniem odczynu wiązania dopełniacza.

A. Kozłowska

D. PRECYPITACJA

Badania przeprowadzone przy pomocy mikroskopu elektronowego oczyszczonych, krystalicznych jednostek mozaiki tytoniowej i osadu precypitacji wytworzonej przez dodanie do zawiesiny mozaiki odpowiedniego antiserum, wykazały ponad wszelką wątpliwość, że osad precypitacji tworzy się głównie z surowicy (Sigurgeirsson, Stanley 1947). Jednostka mozaiki tytoniowej mierzona przy pomocy mikroskopu elektronowego ma 280 mμ długości a 15 mμ szerokości. Przy precypitacji zlepiona z jednostkami sąsiednimi ma 70 mμ szerokości. To znaczy z każdej strony pałeczki wirusowej narosło 27,5 mμ przeciwciał. Przeciwciała wyobrażamy sobie jako wąskie sztabki 27 mμ długie ustawione prostopadle na pałeczce wirusowej (Doer 1947). Na to żeby precypitacja nastąpiła ilość przeciwciał w antiserum musi być odpowiednio duża. Tym samym rozcieńczenie surowicy wpływa ujemnie na jej przebieg. W wypadku gdy białko wirusowe nie jest oczyszczone, pod wpływem odpowiedniego antiserum występuje zjawisko aglutynacji substancji towarzyszących. W soku roślinnym w pierwszym rzędzie chloroplasty ulegają zlepieniu i wypadają w formie osadu.

Metoda precypitacyjna stosowana jest dzisiaj powszechnie do wykrywania utajonego wirusa X w łętach i bulwach ziemniaczanych. Stosowana jest przy tym nie tylko w ścisłych badaniach laboratoryjnych, ale znalazła zastosowanie przy masowych badaniach polowych.

Podstawą zastosowania reakcji serologicznej do wykrywania utajonego wirusa X w ziemniakach było stwierdzenie przez Bawdena (1939) faktu, że wszystkie wyróżnione szczepy tego wirusa dają pre-

cypitację z antiserum otrzymanym z któregokolwiek szczepu badanego. Silnie wirulentne szczepy wirusa X, dające na tytoniu zjawiska nekrozy, dają antisera o wyższym mianie niż szczepy słabo wirulentne dające słabe lub nie dające w ogóle objawów na tytoniu. Bawden F. C. i Kleczkowski A. (1948) stwierdzili w soku pomidora zarażonego w porze zimowej silnie wirulentnymi, wyodrębnionymi przez nich szczepami X^k i X^y, 2 gramy nukleoproteinu wirusowego na 1 litr świeżego soku. Sok taki jeszcze w rozcieńczeniu 1 : 50 000 dawał z odpowiednim przeciwciałem precypitację. Natomiast sok pomidorów opanowanych przez szczep słabszy zawierał w stosunku do szczepów poprzednich dwukrotnie mniejszą ilość nukleoproteinu wirusowego. Sok ten w porze letniej dawał precypitację przy rozcieńczeniu 1 : 250. Wszystkie używane przez Bawdena i Kleczkowskiego siewki tytoniu Biały Burley dawały objawy słabszej lub silniejszej nekrozy. Odpornościowe ich surowice osiągały przy precypitacji najwyższe miana. Bawden, Kassanis, Roberts (1948) używając odpornościowej surowicy X w rozcieńczeniu od 1 do 200 określili w liściach ziemniaka odmiany Majestic dla rozmaitych szczepów wirusa X miano precypitacji, tj. granicę rozcieńczeń soku, przy których precypitacja jeszcze zachodziła. Niskie stosunkowo miano dała precypitacja z sokiem ziemniaka Majestic o łagodnej mozaice. Najwyższe miano precypitacji wykazał szczep wirusa X dający na ziemniaku objawy żółtej plamistości. Do podobnych wyników doszedł Matthews (patrz str. 48) badając szczepy wirusa X na siewkach tytoniu.

Wykorzystując zjawisko precypitacji w celach diagnostycznych, w naszym wypadku dla wykrywania obecności wirusa X w kiełkach i łętach ziemniaczanych, sprawą doniosłą jest wybór metody, która z jednej strony dawałaby pewne o możliwie wysokiej czułości wyniki, z drugiej strony prostej w wykonaniu, pozwalającej na przeprowadzenie badań polowych na możliwie szeroką skalę.

Klasyczną metodą przeprowadzania precypitacji jest metoda probówkowa. Do małych probówek wassermanowskich o średnicy 8 mm wlewany jest ekstrakt rośliny badanej i surowica diagnostyczna w taki sposób, by w miejscu zetknięcia płynów powstała ostra granica. Probówki umieszczane są w łaźni wodnej o temperaturze 50°C. Po 20 minutach w wypadku reakcji pozytywnej w miejscu zetknięcia występuje biały pierścień. Po wymieszaniu płynów po pewnym czasie na dnie probówki tworzy się osad. W przypadku ziemniaczanego wirusa X jest on stosunkowo niewielki. Przy próbie przeprowadzonej w ten sposób sprawą bardzo istotną jest odpowiedni stosunek antygenu do ilości przeciwciał w surowicy; nadmiar jednego lub drugiego składnika hamuje precypitację. Próba musi być dlatego przeprowadzona w kilku powtórzeniach przy rozmaitych rozcieńczeniach surowicy i roślinnego ekstraktu.

Metoda probówkowa znalazła zastosowanie w badaniach polowych zdrowotności ziemniaków w Anglii (Markham, Matthews, Smith 1948). Próbka soku wyciśniętego z liści pochodzących z 10—20 roślin, podgrzanego do 55°C w łaźni wodnej, pozbawionego następnie chlorofilu przez wirowanie, jest w probówce wassermanowskiej zalana odpowiednio rozcieńczoną surowicą i wstawiona na przeciąg 20 minut do łaźni wodnej o temp. 37°C. W razie precypitacji w probówce występuje zmętnienie płynu niewidoczne w nastawionej równocześnie kontroli z surowicą z królika nie szczepionego.

Dla badań polowych Chester (1937) proponował wykrywanie wirusa X w świeżym zielonym soku z liści ziemniaczanych, przez wywoływanie pod wpływem surowicy antiwirus X aglutynacji chloroplastów. Według tego badacza dodając do 2 ml świeżo wyciśniętego zielonego soku, 2 ml rozcieńczonej surowicy diagnostycznej otrzymujemy po 15 minutach w wypadku obecności wirusa X wyraźny zielony osad na dnie probówek, który w wypadku surowicy kontrolnej nie zachodzi.

Znacznie bardziej rozpowszechnionymi od precypitacji probówkowej są metody mikroserologiczne. Po raz pierwszy technikę precypitacji kroplowej wprowadzili Dunin i Popowa (1937). Na szkiełko podstawowe mikroskopu spuszczona jest kropla świeżego nie odwirowanego soku i kropla odpowiedniego rozcieńczonego antiserum. Aglutynacja chloroplastów dowodzi obecności wirusa X.

Świeżyński (1950) zmodyfikował metodę Dunina i Popowa używając zamiast szkiełek podstawowych porcelanowych tafelek o 12-u wgłębieniach. Do poszczególnych zagłębień spuszczane są krople badanego soku, oraz surowica diagnostyczna w różnym rozcieńczeniu. Wstrząsając tafelką po 2-ch napóźniej 5-ciu minutach na brzegach zagłębień występuje w wypadku dodatniego wyniku osad skupionych chloroplastów.

Metodę Dunina i Popowa z pewną modyfikacją zastosowano w USA (Bradley 1952). Autor zwraca uwagę, że aglutynacja chloroplastów występuje niekiedy również w kontroli z surowicą normalną, w takich wypadkach wynik musi być odrzucony.

W Niemczech badania serologiczne dla wykrycia obecności wirusa X w ziemniakach prowadzone są na wielką skalę zmodyfikowaną nieco metodą kropelkową tzw. „Blättchenmethode". Krople surowicy diagnostycznej i kontrolnej są wysuszone na maleńkich skrawkach bibuły. W tym stanie zachowują one aktywność przez szereg lat. Na szkiełku podstawowym umieszczany jest skrawek z surowicą diagnostyczną i skrawek przepojony surowicą normalną, oba zalane zostają kroplami fizjologicznego roztworu soli kuchennej. Po 10 minutach dodawana zostaje kropla badanego soku roślinnego. Po kilkunastu minutach pod ma-

łym powiększeniem mikroskopu na ciemnym polu zaznacza się aglutynacja.

W Holandii zastosowano ostatnio mikroserologiczną metodę pozwalającą wykonać poszczególne reakcje aglutynacji lub precypitacji przy użyciu maleńkich kropli rozcieńczonej surowicy diagnostycznej spuszczanych pasteurowską pipetą na dno szalki Petriego, pokrytej przezroczystym filmem przepojonym roztworem Polyvinylu w chloroformie. Na poszczególne krople surowicy spuszczane są takiej samej wielkości krople soku roślinnego. By przy tak małej ilości płynu nie nastąpiła na skutek natychmiastowego parowania nieswoista aglutyancja, dno szalki po spuszczeniu kropel pokryte zostaje warstwą parafinowego oleju. Dzięki temu wyniki reakcji mogą być obserwowane przez czas dłuższy. Na jednej szalce 10 cm szerokiej można jednorazowo wykonać 40—60 reakcji (Van Slogteren 1955).

W wieloletnich naszych badaniach zastosowana została mikroskopowa metoda kroplowa, stosowana poprzednio z pewnymi modyfikacjami przez licznych autorów (Jermoliew, Hruska 1939, Stapp 1943, Rolland 1945).

Z liścia badanego ziemniaka roztartego w moździerzu porcelanowym sok zbierany jest do wassermanowskiej probówki, następnie natychmiast bez uprzedniego podgrzewania, odwirowany przy 3000 obr./min przez 10 minut tak, że osiąga barwę jasnoseledynową. Kroplę soku odwirowanego umieszczamy na szkiełku podstawowym i dodajemy 1 kroplę nierozcieńczonej surowicy antiwirus X. Równocześnie na tym samym szkiełku dla kontroli do drugiej kropli odwirowanego soku dodajemy kroplę surowicy kontrolnej z królika nie szczepionego. Pod lupą binokularną lub pod małym powiększeniem mikroskopu na ciemnym polu w świetle odbitym wykonujemy obserwacje. Obecność wirusa X w soku uwidacznia się w postaci skupień substancji białkowych w kształcie białych silniej lub słabiej zarysowanych kłaczków. W kropli kontrolnej brak jakichkolwiek skupień jest gwarancją dobrze przeprowadzonej reakcji.

Odwirowywanie soku przed wykonaniem precypitacji jest zabiegiem, szczególniej w wypadku badania liści, zbieranych w porze południowej, koniecznym. W kropli bowiem świeżego zielonego soku pod wpływem surowicy ziarna skrobiowe ulegają agregacji, dając obraz zbliżony do precypitacji wirusowej.

Metoda kropelkowa pozwala w pewnym stopniu na ilościową ocenę białka wirusowego zawartego w tkankach. Intensywność precypitacji określamy w następujący sposób:

+ + + duża ilość dużych wyraźnych kłaczków na szkiełku przedmiotowym,

+ + ilość kłaczków jeszcze dość duża, wielkość ich zmniejszona,

\+ mała ilość skupień białkowych.

Miano precypitacji określamy rozcieńczając sok badany do momentu, gdy precypitacja przy użyciu jednej rozcieńczonej kropli przestaje się tworzyć. Im miano wyższe tym stężenie białka wirusowego większe. Jedynie rośliny całkowicie opanowane przez wirus X dają w każdym liściu pozytywną precypitację, w wypadku natomiast świeżej infekcji obecność wirusa X w poszczególnych organach rośliny uzależniona jest od szybkości przesuwania się schorzenia. Przy określaniu zdrowotności pojedynczej rośliny należy zatem brać średnią z kilku liści.

E. WIĄZANIE DOPEŁNIACZA

Zasada reakcji wiązania dopełniacza jest oparta na doświadczeniu Bordeta i Gengou, (przeprowadzonego w 1901 roku). Polega ona na stwierdzeniu następującego zjawiska: oddzielone od surowicy, oczyszczone czerwone ciałka krwi np. barana, wstrzyknięte królikowi do żyły obwodowej ucha, wywołują w surowicy przeciwciała. Surowica ta podgrzewana w ciągu ½ godziny do temperatury 55°C, pozbawiona w ten sposób ciepłochwiejnej swej części zwanej komplementem, nosi w serologii nazwę surowicy hemolitycznej lub amboceptora. Czerwone ciałka krwi barana wymieszane z amboceptorem, po dodaniu świeżo pobranej ze świnki morskiej, nie podgrzewanej surowicy czyli dopełniacza albo komplementu, ulegają rozpuszczeniu. Zjawisko to służy do wykrywania reakcji jaka następuje pomiędzy białkiem wstrzykiwanym zwierzęciu zwanym antygenem a wywołanym przez niego przeciwciałem. Mianowicie w wypadku połączenia się przeciwciała znajdującego się w surowicy z antygenem, komplement zostaje związany przez wyżej wymieniony kompleks antygen — przeciwciało. Jeśli w tym wypadku do tego kompleksu dodane zostaną krwinki barana uczulone amboceptorem, pozostaną one nienaruszone, gdyż brak jest komplementu, związanego przez połączony antygen z przeciwciałem.

Inaczej przedstawia się to zjawisko w wypadku gdy nie nastąpiła reakcja pomiędzy przeciwciałami a antygenem. Pozostały wolny komplement łączy się wówczas z systemem hemolitycznym, to jest krwinkami uczulonymi amboceptorem, powodując rozpuszczenie krwinek. W ten sposób można poznać, które z badanych wyciągów roślinnych reagują z surowicą diagnostyczną.

Przystępując do wykonania odczynu wiązania dopełniacza przygotować musimy następujące komponenty: wyciągi z badanych roślin, oczyszczone krwinki barana, amboceptor, komplement, wreszcie surowice diagnostyczną i kontrolną.

Wyciągi z badanych roślin, w naszym przypadku z oczek, kiełków i łęt ziemniaka oraz z liści tytoniu i bielunia, przygotowuje się w następujący sposób: 0,3 g materiału badanego uciera się w moździeżu porcelanowym na masę i dolewa 9 ccm roztworu fizjologicznego NaCl

(0,85%). Po dokładnym wymieszaniu zawartość jest zlewana do probówek, które umieszcza się na przeciąg 10 minut w łaźni wodnej o temperaturze 55°C. Następnie wyciągi są w ciągu 15 minut wirowane przy 3000 obr./min. Przed rozpoczęciem doświadczenia stwierdzić należy, czy dany wyciąg rośliny nie hemolizuje samoistnie czerwonych ciałek krwi barana. W wypadku ziemniaka na skutek obecności w soku alkaloidów, niekiedy się to zdarza. W takim wypadku odczyn wiązania dopełniacza nie może być stosowany.

W celu uniknięcia zahamowań hemolizy spowodowanych obecnością w surowicy diagnostycznej przeciwciał przeciw normalnym proteinom zawartym w sokach roślinnych, należy szczególnie w wypadku stosowania surowicy niewytrącanej, dodać do przygotowanych do badania wyciągów roślinnych 0,1 ccm surowicy przeciw zdrowemu białku na 5 ccm przygotowanego wyciągu. Po dokładnym wymieszaniu odstawia się wyciągi na 24 godziny do chłodni. Następnie wiruje się je w ciągu 10 minut przy 8000 obr/min i bezpośrednio poddaje badaniu.

Stosunkowo prosta, dobrze już dziś opracowana metoda elektroforezy bibułowej pozwala ściśle oddzielić w wyciągach roślinnych białka wirusowe od białek normalnych (Gray 1952, Schwarze 1953). Metodą tą można stwierdzić, czy wzięte do badania wyciągi roślinne po wytrąceniu surowicy przeciw zdrowemu białku są istotnie tych substancji pozbawione. Tą samą metodą można zbadać czy wytrącane surowice są pozbawione przeciwciał przeciw zdrowemu białku (Van der Veken 1955).

Wyciągi roślinne można przechowywać w ciągu kilku dni w temperaturze 0°C.

Oczyszczone krwinki barana i amboceptor można otrzymać w każdym zakładzie produkcyjnym surowic dla celów lekarskich. Opis przygotowania powyższych komponentów znaleźć można w podstawowych podręcznikach serologicznych (Przesmycki 1947, Predteczenskij, Borowskaja, Margolina 1950, Rozanow 1952).

Komplement można przygotować samemu, pobierając strzykawką lekarską krew z serca świnek morskich. Konserwowany komplement otrzymać można tak samo jak krwinki barana i amboceptor w zakładach produkcji surowic i szczepionek.

Otrzymanie surowic diagnostycznych, nadających się do przeprowadzenia czułej reakcji odchylenia dopełniacza podane zostało wyżej na stronie **53.**

Reakcja wiązania dopełniacza, stosowana powszechnie w bakteriologii ludzkiej i zwierzęcej, opisana jest we wszystkich podręcznikach serologicznych. W odniesieniu do roślin przebiega ona w następujący sposób (Kozłowska 1950):

Pierwszym zadaniem jest ustalenie właściwej dawki komplementu, warunkującej prawidłowy przebieg reakcji. Zbyt wielka ilość komplementu doprowadza do osłabienia, względnie nawet zaniku słabo dodatnich wyników. Niedostateczna ilość komplementu powoduje zahamowanie hemolizy w kontrolach, co uniemożliwia dokonanie właściwej oceny wyników reakcji. Komplement należy zasadniczo miareczkować wobec każdego badanego antygenu (wyciągu badanej rośliny), zwykle jednak w wypadku jednolitego materiału ograniczamy się do miareczkowania jednego wyciągu z kilku badanych roślin, należących do tej samej odmiany, pochodzącej z tych samych warunków.

Dla poszczególnego badanego wyciągu roślinnego używamy 7 sztuk wassermanowskich probówek, do których nalewamy kolejno komplement według powyższej tabeli:

	1	2	3	4	5	6	7
NaCl 85% w ml	0,40	0,35	0,30	0,25	0.20	0,15	0,25
Wyciąg rozc. w ml	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,10
Surow. kontr. 1 : 10	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Kompl. 1 : 10 w ml.	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40

Napełnione probówki wstawiamy do łaźni wodnej o temperaturze 37°C na przeciąg 40 minut, po czym do wszystkich probówek dodajemy po 0,5 ml zawiesiny uczulonych krwinek barana. Po dokładnym wymieszaniu zawartości umieszczamy probówki powtórnie w łaźni wodnej o temperaturze 37°C na przeciąg 15 minut, po czym odczytujemy wyniki.

Przypuśćmy, że ostatnią probówką w której nie nastąpiło zupełne rozpuszczenie krwinek jest probówka trzecia, w której komplement jest rozcieńczony roztworem fizjologicznym w stosunku 1 : 24. Wobec tego w reakcji wiązania dopełniacza należałoby dla danego wyciągu zastosować to właśnie rozcieńczenie. Ze względu jednak na większą pewność wyników lepiej jest w tym wypadku użyć rozcieńczenie komplementu 1 : 16.

Po ustaleniu dawek komplementu przystępujemy do właściwej reakcji. Celem jej uproszczenia wprowadzamy tylko dwojakie rozcieńczenie surowicy 1 : 10 i 1 : 20. Surowice rozcieńczone 1 : 5 powodują często zahamowanie hemolizy w nieswoisty sposób.

Do zbadania jednego roślinnego wyciągu używamy zestawu złożonego z trzech kolejno ustawionych wassermanowskich probówek. Do pierwszych dwóch dajemy 0,25 cm^3 surowicy diagnostycznej (antiwirus X), w rozcieńczeniu 1 : 10 i 1 : 20, do trzeciej probówki dajemy 0,25 cm^3 roztworu fizjologicznego soli (0,85%). Będzie to probówka kontrolna, wskazująca, czy zahamowanie hemolizy jest uwarunkowane jedynie

działaniem surowicy diagnostycznej. Następnie do wszystkich trzech probówek dodajemy 0,25 cm³ badanego wyciągu roślinnego, wreszcie 0,25 cm³ komplementu, rozcieńczonego według miareczkowania. Probówki umieszczamy w łaźni wodnej o temperaturze 37°C na przeciąg 40 minut, po czym do wszystkich probówek nalewamy 0,5 cm³ zawiesiny uczulonych krwinek barana. Po dokładnym wymieszaniu umieszczamy probówki powtórnie w łaźni wodnej na przeciąg 15 minut, po czym odczytujemy wynik reakcji.

Równocześnie w zupełnie ten sam sposób nastawione być musi doświadczenie, w którym w tym samym zestawie, zamiast surowicy diagnostycznej, dodana jest surowica normalna ze zdrowego nie szczepionego królika. Wyniki otrzymane w reakcji wiązania, są jedynie wtedy miarodajne, o ile zarówno w trzeciej probówce pozbawionej surowicy, jak i w zestawie z surowicą normalną nastąpi całkowita hemoliza krwinek.

Stopień zahamowania hemolizy z surowicą diagnostyczną może wykazywać rozmaity stopień nasilenia, który oznaczamy w sposób następujący: +++ oznaczają zupełne zahamowanie hemolizy (wynik dodatni), ++ częściowe zahamowanie hemolizy, + zahamowanie słabe, ± zahamowanie ledwie zaznaczone (wynik wątpliwy), wreszcie — zupełna hemoliza, wynik ujemny.

F. ZNACZENIE REAKCJI WIĄZANIA DOPEŁNIACZA DLA WYKRYWANIA UTAJONYCH SZCZEPÓW WIRUSA X

Odczyn odchylenia dopełniacza, używany powszechnie w diagnostyce lekarskiej wykazuje w porównaniu z precypitacją co najmniej 10-krotnie większą czułość. Jest przeto oczywiste, że może on dać wynik dodatni tam, gdzie precypitacja już nie zachodzi (Landsteiner 1945). Dotyczy to zarówno ilości substancji wirusowych w antygenach, w danym wypadku wyciągach roślinnych, jak w wyższym jeszcze stopniu wysokości miana surowicy. Według Merilla (1936) dla wirusów zwierzęcych wystarcza od 0,001 do 0,0001 mg antygenu wirusowego, by wystąpiła precypitacja. W wypadku mozaiki tytoniowej, przy nie rozcieńczonej surowicy, potrzeba 0,005 mg białka wirusowego by w wassermanowskiej probówce wystąpiła charakterystyczna precypitacja. W porównaniu z mozaiką tytoniową oczyszczony ekstrakt wirusa X daje wielokrotnie słabsze zjawisko precypitacji, tym samym ilość białka wirusowego potrzebna do wywołania tego zjawiska musi być jeszcze większa. Reakcja wiązania dopełniacza daje natomiast wynik pozytywny, gdy zarówno ilość jednostek wirusowych jak i ilość przeciwciał w surowicy dochodzą zaledwie do wielkości kilku γ.

W opisanej przez nas metodzie 0,25 cm³ soku, wyciśniętego z badanych liści w 30-krotnym rozcieńczeniu, odpowiada 0,008 cm³ soku nie

rozcieńczonego. Ilość ta w reakcji odchylenia dopełniacza daje przy wielokrotnych powtórzeniach ten sam zawsze wynik, zarówno przy całkowitym zahamowaniu hemolizy (+++), jak i wtedy, gdy jest ono częściowe. Nie jest to jednak bynajmniej dolna granica wyznaczająca stopień czułości odczynu odchylenia dopełniacza w odniesieniu do ziemniaczanego wirusa X. W doświadczeniach naszych wyciągi z liści tytoniu, opanowanego przez objawowe szczepy wirusa X, dawały zahamowanie hemolizy z odpowiednim antiserum przy rozcieńczeniu 1 : 6000. Ponieważ ilość używanego do reakcji soku wynosi 0,25 cm^3, zatem rozcieńczenie to odpowiada 0,0004 mm^3 świeżego soku.

Dla wykonania próby precypitacji na szkiełku podstawowym potrzebna jest kropla świeżego soku = 0,1 cm^3. W wypadku jeśli miano precypitacji wynosi 1 : 40, to znaczy sok 40-krotnie rozcieńczony, daje dolną granicę precypitacji, ilość koniecznego w tym wypadku do otrzymania tej reakcji soku wynosi 0,025 mm^3. Jest to ilość 60-krotnie większa niż ta która wystarcza do reakcji wiązania dopełniacza.

Czułość metody odchylenia dopełniacza tam, gdzie precypitacja zawodzi, ma znaczenie w pierwszym rzędzie w wypadku szeroko rozpowszechnionych szczepów bezobjawowych wirusa X. Zgodnie z doświadczeniami polowymi licznych badaczy (Roland 1945, Jermoliew, Hruska 1947), prowadzone przez nas przez szereg lat badania wykazały, że zdrowo wyglądające ziemniaki dają z reguły pozytywną precypitację z surowicą antiwirus X, o ile sok ich przeszczepiony na siewki tytoniu wywołuje na tych ostatnich chorobowe objawy. Dla stwierdzenia w jakim stopniu odczyn odchylenia dopełniacza wykrywa wirusa X w jego bezobjawowych szczepach, przeprowadzonych zostało w naszym zakładzie szereg doświadczeń i obserwacji.

Doświadczenie I.

Do badania wzięte zostały bulwy ziemniaka odmiany „Bintie", sprowadzone z Belgii, wolne od wirusa X, oraz bulwy odmiany „Prezydent", mające wygląd zdrowy, nie wykazujące objawów chorobowych na tytoniu, będące w hodowli szklarniowej od 1946 roku. Z bulw obu odmian wypreparowane zostały kolejne oczka oraz fragmenty skórki wiązki sitowo-naczyniowej i tkanki zapasowej. Wyciągami tych poszczególnych elementów zaszczepiono siewki tytoniu, wykonywując jednocześnie odczyn odchylenia dopełniacza. Jak to wykazuje tabela 1, odmiana „Bintie" dała we wszystkich wypadkach wynik ujemny w reakcji wiązania dopełniacza, gdy odmiana „Prezydent" w oczkach koronowych i tkance przewodzącej wykazała obecność wirusa X. Siewki tytoniu po 2 tygodniach w jednym i drugim wypadku nie miały żadnych chorobowych objawów. W reakcji wiązania dopełniacza nastąpiło zahamowanie hemolizy z surowicą antiwirus X jedynie u tytoni, na których przeszczepiony był sok z odmiany Prezydent.

Tabela 1

Wynik wiązania dopełniacza fragmentów bulw odmian „Bintie" i „Prezydent"

	1	2	3	4	5	6	7	Skórka	Pod skór.	Wiązka nacz. sitow.	Tkanka zapasowa
Bulwa „Bintie"	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Tytoń (Biały Burley)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Bulwa „Prezydent"	+++	++	+	++	—	—	—	—	—	+++	+
Tytoń (Biały Burley)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	—	+	+++	+++

Doświadczenie II.

Kiełki ziemniaków sprowadzone z Pomorza, należące do szeregu rodów, przeszczepiane na tytoń, nie wywoływały na tym ostatnim żadnych chorobowych objawów. Niemniej sok otrzymany z tych tytoni, nie dając precypitacji, powodował zahamowanie hemolizy z surowicą antiwirus X w reakcji wiązania dopełniacza.

Tabela 2

Wynik wiązania dopełniacza kiełków i precypitacji przeszczepionych tytoni

Data		5 V		20 V	20 V
Rody ziemniaka		½ kiełka wiąz. dop.		Tytoń bez objawów	
				Wiąz. d.	precypit.
Capella billa	1	—	kiełki przeszczepiono na tytoń	+++	—
	2	—		+++	—
	3	+		+++	—
	4	±		+++	—
	5	—		+++	—
926	1	—		+++	—
	2	—		+++	—
	3	+		+++	—
	4	+		+++	—
	5	—		+	—
509	1	—		+++	—
	2	—		+++	—
	3	—		+++	—
	4	—		+	—
	5	—		+	—
313	1	+		+++	—
	2	—		+++	—
	3	—		—	—
	4	—		+	—
	5	—		+++	—

Sok otrzymany z wyrośniętych z tych bulw łęt, wyglądających zupełnie zdrowo, dał w pewnym procencie zahamowanie hemolizy z surowicą antiwirus X w wiązaniu dopełniacza. Tytonie natomiast, na których łęty te zostały przeszczepione, nie wykazując żadnych objawów, dały pozytywną reakcję odchylenia dopełniacza we wszystkich wypadkach. Tam gdzie na liściach tytoniu dała się zauważyć delikatna mozaika, precypitacja dała wynik pozytywny, w innych wypadkach nie wystąpiła zupełnie.

Tabela 3

Wynik odchylenia dopełniacza i precypitacji łęt i przeszczepionych tytoni

Rody ziemniaka		Łęty wiąz. dop.	Łęty przeszczepione na tytoń	Tytoń *Nicotiana tab.* Wiąz. dop.	Tytoń *Nicotiana tab.* precyp.
54	1	+		+++	—
	2	++		++	—
53	1	+		+++	—
	2	+		+++	+ (mozaika)
81	1	—		+++	—
	2	++		+++	—
	3	—		++	—
926	1	—		+++	—
	2	++		+++	—
326	1	—		+++	—
	2	+++		+++	—
18	1	+		+++	+ (mozaika)
	2	—		+++	—

Z doświadczeń tych wynika jasno wzrost białka wirusowego w liściach tytoniu w porównaniu z ziemniakiem. Wtedy gdy w kiełkach ziemniaka wirus X nawet odchyleniem dopełniacza nie mógł być stwierdzony, na tytoniu tą samą metodą został wykryty.

Tabela 4

Ród 81

I rok	Wiąz. dop. oczka 21. IV	Wiąz. dop. kiełki 24. V	24. V	Wiąz. dop. tytoń 10. VI	II rok	Wiąz. dop. kiełki 27. IV	27. IV	Wiąz. dop. tytoń 17. V	III rok	Wiąz. dop. kiełki 27. IV	Wiąz. dop. łęty 11. VII
1	—	±	Kiełki przeszczepione na tytoń	±	1	—	Kiełki przeszczepione na tytoń	—	1	+++	+++
2	—	±		+	2	++		+++	2	+++	+++
3	—	±		++	3	++		+++	3	+++	+++
4	—	±		++	4	+		+++	4	+++	+++
5	—	±		++	5	—		+++	5	+++	+++

Stosując metodę odchylenia dopełniacza zarówno w badaniu kiełków, łęt jak i szczepionych tytoni, możemy w sposób najbardziej wnik-

liwy śledzić wzrost białka wirusowego w roślinie w czasie następujących po sobie okresów wegetacji. Przykładowo przedstawia to załączona tabela.

Objaśnienie znaków: — wynik negatywny, hemoliza całkowita, ± ślad zahamowania hemolizy, + słabe zahamowanie hemolizy, + + częściowe zahamowanie, + + + całkowite zahamowanie hemolizy.

8. METODY OPTYCZNE

A. BADANIA PRZY UŻYCIU SPEKTROFOTOMETRU

Roztwór oczyszczonego białka wirusowego jest bezbarwny i wykazuje bardzo słabą absorpcję światła białego, natomiast w świetle ultrafioletowym jego zdolności absorpcyjne wybitnie rosną, dochodząc do maksimum przy 2620 Å. Absorpcja ta jest charakterystyczna dla związków purynowych o heterocyklicznym układzie. W wypadku wyciągów białek wirusowych ten typ absorpcji stoi w prostym stosunku do ilości fosforu. Ziemniaczany wirus X, zawierający 0,5% fosforu, wykazuje przy 2620 Å słabszą absorpcję niż np. wirus krzaczastości pomidorów „bushy stunt virus", zawierający 1,5% P.

Absorpcyjne spektrum soków roślinnych, badanych w świetle ultrafioletowym, posłużyło w ciągu lat ostatnich do opracowania nowej szybkiej spektrofotometrycznej metody wykrywania obecności białka wirusowego w zielonej tkance rośliny (Lindner i inni 1952). Metoda ta została opisana na przykładzie pierścieniowego wirusa czereśni, dającego się przeszczepić na liścienie ogórka (Kirkpatrick, Lindner 1954).

Z zarażonych liścieni ogórka wycinane są jednakowej wielkości krążki, które zostają odbarwione 70% alkoholem w temperaturze 80°C. Krążki poddawane są następnie hydrolizie: zalane alkoholem i HCl w stosunku 9 : 1 i podgrzewane do 80°C przez 30 minut. W ten sposób otrzymany hydrolizat jest poddawany spektrofotometrycznej analizie. Zarówno wyciąg ze zdrowych liści jak i z porażonych chorobą wirusową wykazuje maksymalną absorpcję światła przy 2620 Å. W obu wypadkach występuje jednak wyraźna różnica polegająca na różnej gęstości optycznej, obliczanej według prawa Lamberta-Beera (Gałecki, 1954). W wypadku pierścieniowej nekrozy wirusa czereśni, ilość zaabsorbowanego światła przy 2620 Å była w hydrolizacie liścieni chorych ogórków 25 do 35 razy większa niż w hydrolizacie pochodzącym z liścieni zdrowych.

Metoda ta wymagająca spektrofotometru jest szybka (ponad 100 oznaczeń może być wykonanych w ciągu jednego dnia). Pozwala ona jednocześnie na ilościowe określenie białka wirusowego w tkankach, oczywiście bez określenia rodzaju i jakości samego schorzenia.

B. BADANIA W ŚWIETLE SPOLARYZOWANYM

Metoda badania białka wirusowego w świetle spolaryzowanym opiera się na znanym w fizyce zjawisku, że roztwory w których wydłużone cząstki ciała rozpuszczonego ustawiają się do siebie równolegle, jak unoszone wodą zapałki, dają w świetle spolaryzowanym zjawisko świecenia, podobnie jak kryształy. Zjawisko to nosi nazwę anizotropii w prądzie lub podwójnego załamania w prądzie.

Jeśli do roztworu, zawierającego ciało rozpuszczone w kształcie igiełkowato wydłużonych cząstek, jak np. do roztworu pięciotlenku wanadu, postawionego w naczyniu, na ciemnym polu między dwoma skrzyżowanymi nikolami, zanurzymy pipetkę o wydłużonym końcu i wciągnięty do niej płyn będziemy wypuszczać do roztworu, wytwarzając w ten sposób prąd, to wywołamy zjawisko świecenia w formie jasnych, rozchodzących się wraz z ruchem płynu smug.

Takahashi i Rawlins (1933) pierwsi stwierdzili, że sok wyciśnięty z porażonych mozaiką tytoniową liści tytoniu badany w mikroskopie polaryzacyjnym między skrzyżowanymi nikolami na ciemnym polu, daje zjawisko podwójnego załamania w prądzie. Natomiast sok wyciśnięty ze zdrowych liści tytoniu zjawiska tego nie powoduje. Stąd wyciągnięto wniosek: jednostki wirusowe mozaiki tytoniowej muszą mieć kształt wydłużonych krystalicznych pałeczek. Badania te pozwoliły tym samym na wykrycie struktury kryształów mozaiki tytoniowej znacznie przed uzyskaniem ich obrazu w mikroskopie elektronowym.

Białka wirusowe o niewydłużonych kryształach dekaedrów, jak np. wirus krzaczastości pomidorów „bushy stunt virus", nie wykazuje oczywiście podwójnego załamania w prądzie.

Ziemniaczany wirus X o nitkowatych, długich kryształach daje podobnie jak wirus mozaiki tytoniowej zjawisko podwójnego załamania w prądzie. Ma to duże znaczenie przy otrzymywaniu ekstraktów wirusa X z zielonych liści. Jak to podkreślono w rozdziałach poprzednich wirus X wyodrębniany z soku, wyciśniętego z liści, niezmiernie łatwo przechodzi w stan nierozpuszczalny, ulegając agregacji. Badanie w świetle spolaryzowanym otrzymywanych w trakcie oczyszczenia kolejnych odsączy, pozwala na stałą kontrolę obecności wirusa X w badanym płynie. Jeśli białko wirusa X przejdzie w stan nierozpuszczalny, pozostając w osadzie, w odsączu w mikroskopie polaryzacyjnym nie wystąpi zjawisko podwójnego załamania w prądzie (Bawden, Pirie 1938).

Wirus smugowatości Y w słabszym stopniu niż wirus X, ale wykazuje również podwójne załamanie w prądzie. Wskazuje to na wydłużoną budowę, trudno w mikroskopie elektronowym dostrzegalnych, jego krystalicznych jednostek.

Częściowo oczyszczone substancje białkowe zawarte w soku, wyciśniętym z bulw ziemniaków, porażonych wirusem X i Y, badane w świetle spolaryzowanym dają niekiedy dające się zauważyć zjawisko podwójnego załamania w prądzie (Hausbrandt 1948).

Zakład Wirusologii IHAR, Kraków

LITERATURA

1. Bald J. G., White N. H. 1942. Potato virus X. The average severity of strain mixtures in three varieties of potato. J. Con. Sci Ind. Res. Austr. 15,300.

2. Baribeau B., Gagnon R. 1946. L'indexage des pommes de terre de semence. Agriculture (Quebec) III, 2, 15.

3. Bartels R. 1953. Ein Beitrag zur Frage der Wurzelübertragung der Kartoffel X Virus. B. 23, 280.

4. Bartels R. 1955. Serologische Untersuchungen über die Konzentration des X Virus in Kartoffelstauden während der Vegetationsperiode. Phytopath. Zeitsch. Band. 24, Heft 4, 421.

5. Baumann H. 1954. Zur Frage des Kartoffelabbaues in der Uebergangslage. Deutsche Landw. J. 5, 11, 570.

6. Bawden F. C. 1935. The relationship between the serological reactions and the infectivity of potato virus X. Brit. Journ. of Exper. Pathol. 16, 435.

7. Bawden F. C. 1950. Plant Viruses and Virus Diseases. Chronica Botanica.

7a. Bawden F. C. 1954. Inhibitors and Plant Viruses. Advances in Virus research. Vol. II. 34. Academic Press New York.

8. Bawden F. C., Crook F. M. 1947. Some properties of potato virus X in leaf extract made in different ways. Brit. J. exp. Path. No 6.

9. Bawden F. C., Kassanis B. 1946. Varietal differences in susceptibility to potato virus Y. Ann. appl. Biol. Vol. 33, No 1.

10. Bawden F. C., Kassanis B. 1947. The behaviour of some naturally occurring strains of potato virus Y. Ann. appl. Biol. 34, 503.

11. Bawden F. C., Kassanis B. Roberts F. M. 1948. Studies on the importance and control of potato virus X. Ann. app. Biol. Vol. 35. No 2.

12. Bawden F. C., Kassanis B. 1951. Serologically related strains of potato virus Y that are not mutually antagonistic in plants. Vol. 38, 502.

13. Bawden F. C., Kleczkowski A. 1948. Variations in the Properties of Potato Virus X and their Effects on its Interactions with Ribonuclease and Proteolitic Enzymes. Journ. Gen. Microbiol. Vol. 2, No 2, 173.

14. Bawden F. C., Nixon H. L. 1951. The application of electron microscopy to the study of plant viruses in unpurified plant extracts. J. Gen. Microb. 5, 104.

15. Bawden F. C., Pirie N. W. 1936. Experiments on the Chemical Behaviour of potato Virus X. Brit. Exp. Path. 17, 64.

16. Bawden F. C., Pirie N. W. 1938. Liquid cristalline preparations of potato virus X. Brit. J. Exper. Pathol. 19, 66.

17. Bawden F. C., Pirie N. W. 1938. A note on some protein constituents of normal tobacco and tomato leaves. Brit. J. Exper. Path. 19, 264.

18. Bawden F. C., Pirie N. W. 1939. The purification of insect transmitted plant viruses. Brit. J. Exp. Path. Vol. 20, 322.

19. Bawden F. C., Pirie N. W. 1953. Virus multiplication considered as a form of protein synthesis. Symposium Soc. gen. microb. Cambridge.

20. Bawden F. C., Sheffield F. M. L. 1944. The relationship of some

viruses causing necrotic diseases of potato. Ann. Appl. Biol. 31, 33.

21. Bechhold und Erbe F. 1933. Zur Biologie der Kartoffel. 14 Mitteilung. Studie über die Kolloidstruktur der Kartoffelknolle. Arb. d. Biol. R. Anst. 1933 t. 20.

22. Beemster A. B. R. 1953. Virustransport innerhalb der Kartoffelpflanze. Mitt. Biol. Bund. Berlin Dahlem H. 80, 136.

22a. Benett C. W. 1953. Interactions Between Virus Strains. Advances in Virus Research. Vol. I. s. 39. Academic Press. N. York.

23. Bercks. R. 1953. Fortgeführte Untersuchungen über das Infektionsvermögen verschiedener X-Virusherkünfte gegenüber Kartoffeln. Vol. 23, 289.

24. Bercks R. 1954. Untersuchungen über Änderungen des Virusgehaltes in Tabakpflanzen während der Vegetationsperiode. Phytop. Zeitschr. Band 22. Heft 2.

25. Bercks R. 1954. Bedeutung und Erfolge der Serologie in der Virusforschung. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt f. Land- und. Forstwirtschaft. Heft 81, 34.

26. Bercks R. 1955. Virusgehalt von Tabakpflanzen bei Mischinfektionen durch Kartoffel X- und Y-virus. Phytop. Zeitschr. Band. 24. Heft 4, 407.

27. Best R. J. 1936. Austral. J. Exper. Biol. and Med. Sci. 14, 199.

28. Bonde R., Schulz E. S., Raleigh W. P. 1943. Rate of spread and effect on yield of potato virus diseases. Bull. Maine Agri. Exp. Sta. 421, 1.

29. Bradley R. H. E. 1952. A rapid method of testing plants in the field for Potato virus X. American Potato J. Vol. 29 N. 12, 289.

30. Bradley R. H. E. 1954. Studies of the mechanism of transmission of potato virus Y by the green peach aphid *Myzus persicae*. Cand. J. Zool. 32.

31. Broadbent L. 1950. The correlation of aphid numbers with the spread of leaf roll and rugose mosaic in potato crops. Ann. App. Biol. Vol. 37. No 1, 58.

32. Broadbent L. 1953. Aphids and virus diseases in potato crops. Biol. Review. Vol. 28, 350.

33. Broadbent L., Gregory P. H. Tinsley T. W. 1952. The influence of planting date and manuring on the incidence of virus diseases in potato crops. Ann. Appl. Biol. Vol. 39. 509.

34. Broadbent L., Tinsley T. W. 1951. Experiments on the colonization of potato plants by Apterous and by *Alatae* Aphids in relation to the spread of virus diseases. Ann. Appl. Biol. Vol. 38, No 2, 411.

35. Bukasow S. M. i Kameraz A. J. Selekcja kartofiela. Ogiz — Sielchogiz Moskwa 1948.

36. Chester K. S. 1935. Antigenitici of the plant viruses. Phytopath. 25. 702—714, 1935.

37. Chester K. S. 1936. Separation and analysis of virus strains by means of precipitation tests. Phytopath. 26. 778.

38. Chester K. S. 1937. A simple and rapid method for identifying plant viruses in the field. Phytopath. 27, 722.

39. Clinch P. E. M. 1944. Observations on a severe strain of potato virus X. Sci. Proc. R. Dublin, Soc. N. S. 23, 273.

40. Davies W. M. 1932. Ecological studies on aphides infesting the potato crops. Bull. Entom. Res. T. 23.

41. Davies W. M., Whitehead T. 1933—1938. Studies in aphidies infesting the potato crop. I—VII Ann. Appl. Biology T. 21.

42. Doerr R. 1947. Antikörper I. Die Immunitätsforschung. Wien.

43. Doncaster J. P., Gregory P. H. 1948. Spread of virus diseases in the potato crop. Agricultural Research Council.

44. Dunin M. S., Popowa N. N. 1937. Kapelnyj metod analiza wirusow w rastienjewodstwie. Sielchozgiz. 46. Moskwa.

45. Dvorak M. 1927. The effect of mosaic on the globulin of potato. Journal on Infections Disease. 41. 215—221.

46. Eicke R., Bode O. 1947. Zur Betrachtung von Virussymptomen in ultraviolettem Licht. Arch. Gesam. Virusforschung. Band III. H. 6, Wien,

47. Gałecki J. 1954. Analiza kolorymetryczna. Kalendarz Chemiczny. Część I. Państw. Wyd. Tech. Warszawa, str. 1626.

48. Garbowski L. 1933. Choroby wirusowe ziemniaków w okresie od 1928 do 1932. Bydgoszcz.

49. Garbowski L. 1936. Ocena zdrowotności kłębów ziemniaczanych drogą wstępnej hodowli kiełków. Prace wydziału chorób roślinnych. Bydgoszcz, Nr 15, str. 31.

50. Garbowski L. 1938. Choroby wirusowe ziemniaków. Bydgoszcz.

50 a. Gray R. A. 1952. The electrophoresis and chromatography of plant Viruses on filter paper. Arch. Bioch. 28, 305.

51. Haine E. 1954. Studien und Experimente zur Frage des Populations und Massenwechsels und des Flugverhaltens virusübertragender Blattläuse. Anz. Schädlingskde. 17.

52. Hausbrandt L. 1941. Próby oceny zdrowotności ziemniaka na podstawie badania białka bulw metodami optyczną i serologiczną. Acta Soc. Bot. Pol. Vol. XIX, 1, 84.

53. Hey A. 1933. Zur Biologie der Kartoffel. XIV Mitteilung. Die Diagnose des Abbaugrades von Kartoffelknollen durch elektrometrische Messung. Arb. d. Biol. R. Anst. 1933, t. 20.

54. Hirszfeld L. 1948. Immunologia ogólna. Spółdzielnia Wydawnicza „Czytelnik".

55. Holmes F. O. 1929. Local lesions in tobacco mosaic. Bot. Gaz. 87, 39.

56. Ingold C. T. 1929. The hydrion concentration of plant tissues. X Buffers of the potato tuber. Protoplasma. Band VI. 51.

57. Jermoliev E., Hruska L. 1947. Serologicka metoda urcovani virovych chorob u brambori. Sbornik vyzkumnych ustawu C. S. R. Svorek 178. 1.

58. Kaho H. 1935. Zur Physiologie der Kartoffel II. Ein Beitrag zur Diagnose abbaukranker Kartoffel. Phytopat. Zeitschr., t. VIII.

59. Kalmus H., Kassanis B. 1945. The use of abrasives in the transmission of plant viruses. Ann. Appl. Biol. Vol. 32, Nr 3, 230.

60. Kameraz A., Anikiew A. M. 1937. Issliedowanje dopressji kartofiela po mietodu Bechholda i Erbe. Trudy po Prikładn. Botanikie i selek. Seria II, No 11.

61. Kanngiesser W. und Deubner B. 1954. Veränderungen des elektronenmikroskopischen Bildes von Kartoffel X Virus unter dem Einfluss verschiedener Chemikalien. Archiv gesam. Virusforschung. Band V, Heft 5, 483.

62. Kirkpatrick H. C. Lindner R. C. 1954. A rapid spectrophotometricassay for some plant viruses. Phytopath. 44, 525.

63. Kleczowski A. 1950. Interpreting relationships between the concentrations of plant viruses and numbers of local lesions. Journ. Gen. Micr. Vol. 4, Nr 1, 53.

64. Köhler E. 1938. Beobachtungen über Virusresistenz bei Kartoffelsorten. Der Züchter, 12, 321.

65. Köhler E. 1940. Der Virusnachweis an Kartoffeln. Berlin 1940.

66. Köhler E. 1953. Der *Solanum demissum*-Bastard „A6" als Testpflanze verschiedener Mosaikviren. Der Züchter. B. 23, 173.

67. Köhler E., Ross H. 1953. Das Verhalten deutscher Kartoffelsorten gegenüber verschiedenen Stämmen des X-Virus im Topfversuch. Züchter 21, 179 und 23, 72.

68. Kozłowska A. 1946. The changes caused by ammonium molyb-

date and virus diseases of plants. Bull. Acad Polon. Serie B. Cracovie, 109.

69. Kozłowska A. 1950. Investigation of masked virus X in potatoes by complement fixation test. Bull. Acad. Pol. Serie B. 65.

70. Kozłowska. A. 1950. Investigations on the strains of potato virus X in ultraviolet light. Bull. Acad. Pol. Serie B.

71. Kozłowska A. 1953. Z zagadnień wpływu wysokich temperatur i wilgotności gleby na nasilenie wirusa X w tkance ziemniaka. Acta Agrob. Vol. 1.

71 a. Kozłowska A. 1954. Zagadnienie degeneracji ziemniaka w świetle 6-letnich doświadczeń. Postępy Nauki Rol. Rok I, nr 2.

72. Ladeburg R. C., Larson R. H., Walker J. C. 1950. Origin interrelation and properties of ringspot strains of virus X in American potato varieties. Wis. Agr. Exp. Sta. Res. Bull. 156.

73. Landsteiner K. 1945. The specifity of serological reactions. Harvard Univ. Press.

74. Larson R. H. 1946. Serological relationship between potato latent ringspot and virulent ringspot viruses. Phytopath. 36, 404.

74 a. Larson R. H., Stahmann M. A. Walker J. C. 1955. The induction of mutants in Potato Virus X by nitrogen mustard. Proc. of the second confer. on Potato Virus Diseases. Wageningen.

75. Lindner R. C., Kirkpatrick H. C. and Wecks T. E. 1952.. Ultraviolet absorption spectra as a tool for diagnosing plant virus diseases. Science 115, 496.

76. Longhman J. B., Murphy P. A. 1938. Dissemination of potato viruses X and F by leaf contact Sci. Proc. R. Dublin Soc. N. S. 22, 1.

77. Marion A., Watson, Nixon H. L. 1953. Studies on the feeding of *Mysus persicae.* on radioactive plants. Ann. Appl. Biol. Vol. 40, No 3, 537.

78. Marcus O. 1953. Über die Y Virusverseuchung der Knollen primar infizierter Kartoffelpflanzen. Phytop. Zeit. Band 20, Heft 2.

79. Markham R., Matthews R. E. F., Smith K. M. 1948. Testing potato stocks for virus X. Farming 41.

80. Markham R., Smith J. D. 1954. Nucleoproteins and Viruses. 1954 The Proteins. Vol. II Part A, 1. Academic Press. New York.

81. Matthews R. E. F. 1947. Status of potato virus B. Nature Vol. 159, 713.

82. Matthews R. E. F. 1948. Plant virus proteins and antibody — antigen reactions. Nature 161.

83. Matthews R. E. F. 1949. Studies on potato virus X. Criteria of relationships between strains. Ann. Appl. Biol. Vol. 36, No 4, 448.

84. Matthews R. E. F. 1949. A Reactions of *Cyphomandra betacea* to strains of potato virus X. Parasitology 39, 241.

85. Matthews R. E. F. 1953. Factors affecting the production of local lesions by plant viruses. I. The effect of time day of inoculation. Ann. App. Biol. Vol. 40 No 2, 377.

86. Matthews R. E. F, 1953. Factors affecting the production of local lesions by plant viruses. II. Some effects of light, darkness and temperature. Ann. of App. Biol. Vol. 40 No 3, 556.

87. McIntosh T. P. 1944. Potato troubles. Gardeners Chron. 116. 87.

88. Merill M. H. 1936. The mass factor in immunological studies upon viruses. J. Immunol. (Am.) 30, 169.

89. Müller H. J., Unger K. 1952. Über den Einfluss von Licht, Wind, Temperatur und Luftfeuchtigkeit auf den Beffallsflug der Aphiden. Züchter 22, 206.

90. Natti J., Kirkpatrick H. C., Ross F. 1953. Host range of potato leafroll virus. Amer. Potato J. 30 Nr 3, 55.

91. Newton W. and Edwards H. J. 1936. Virus Studies I. The productions of antisera in chickens by inocu-

lation in potato X virus. Canadian Journ. Res. C 14, 412.

92. Nobrega N. R., Silberschmidt K. 1944. On a suspected variant of the potato virus Y (*Solanum* virus 2, Orton), which causes necrosis on tobacco plants. Arq. Inst. Biol. S. Paulo 15, 307.

93. Pirie N. W. 1950. The isolation from normal Tobacco leaves of nucleoprotein with some similarity to plant viruses. The biochem. Jour. 47, 614.

94. Prochal P. 1953. Rozmieszczenie utajonego wirusa X w bulwie ziemniaczanej. Acta Agrobiol. Vol. I, 33.

95. Przesmycki F. 1947. Zarys bakteriologii praktycznej. Lekarski Instytut Wydawniczy. Warszawa.

96. Priedtieczienskij W. E. Borowskaja B. M. Margolina L. T. 1950. Rukowodstwo po taboratornym mietodam issliedowanja. Izd. 4. Moskwa.

96a. Ragetli H. N., van der Scheer CH., van der Want J. P. 1955. Electron-microscopy of fractions obtained by paperchromatography from juices of virus diseased and healthy plants. T. Pl. ziekten 61, 35. Wageningen.

97. Raychaudhuri S. P. 1953. Dilution curve of a ring-spot strain of potato virus X. Am. Pot. J. Vol. 30. No 6, 134.

98. Roberts F. M. 1946. Underground Spread of Potato Virus X. Nature Vol. 158, 663.

99. Roberts F. M. 1948. Experiments on the spread of potato virus X between plants in contact Ann. Appl. Biol. Vol. 35, No 2.

100. Roberts F. M. 1950. The infection of plants by viruses through roots. Ann. Appl. Biol. Vol. 37, No 3, 385.

101. Roland G. 1945. Sur une micromethode sérologique pour l'étude des viroses végétales. Parasitica 1, 106.

102. Roland G. 1946. Contribution a l'étude de la population aphidienne des champs de pomme de terre de divers regions belges etc. Parasitica T. II No 1.

103. Roland G. 1946. Sur la resistance de défence des varietés de pomme de terre a l'égard du virus Y. Parasitica. T. II No 3.

104. Roland G., Fagel G. 1949. Contribution à l'étude de la transmission du virus Y (*Solanum virus* 2 Orton) Parasitica. T. V No 3.

105. Ross H. 1954. Über die extreme Resistenz von *Solanum acaule* gegen das X-Virus. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft. Heft. 80. 144.

106. Rozanow N. I. 1952. Mikrobiołogiczeskaja djagnostika zabolewanij sielskochoziajstwiennych żiwotnych. Moskwa.

107. Rozendaal A. I. 1954. The significance of different Virus groups in the production of seed potatoes. Wageningen Meddeling No 143.

107a. Rozendaal A., Brust J. H. 1955, The significance of potato virus S in seed potato culture. Proceedings of the second conference on potato virus diseases. Wageningen.

108. Sadasivan T. S. 1940. A quantitative study of the interaction of viruses in plants. Ann. App. Biol. Vol. XXVII No 3, 359.

109. Salaman R. N. 1938. The potato virus X. its strains and reactions. Phil. Trans. London B. 229, 137.

110. Samuel G., Bald J. G. 1933. On the use of the primary lesions in quantitative work of two plant viruses. Ann. Appl. Biol. 20, 70.

110a. Schwarze P. 1953. Die Zerlegung des Eiweiss Komplexes der Kartoffelknolle durch Papierelektrophorese. Naturwissenschaften 40, 21.

111. Siemaszkowa J. 1952. Badania nad mszycami ziemniaczanymi. Roczn. Nauk Roln. Tom. 64.

112. Sigurgeirsson T., Stanley W. M. 1947. Electron microscope studies in tobacco mosaic virus. Phytopathology 37, 26.

113. Schulz E. S., Clark C. F., Raleigh W. P., Stevenson F. J., Bonde R., Beaumont J. H. 1937. Recent development in potato breeding for resistance to virus diseases. Phytop. 27, 100.

114. Smith K. M. 1937. Textbook on Plant Viruses. London.

115. Spooner E. T. C. and Bawden F. C. 1935. Experiments on the serological reactions of the potato virus X. Brit. Jour. Exp. Biol. 16, 218.

116. Stapp C. S. 1943. Bedeutung und Wert der serologischen Virusdiagnose für die Kartoffelzüchtung. Der Züchter 15, 184.

117. Stuart W. 1933. Seed potatoes and how to produce them. U. S. Dep. of Agrc. Farmers Bull. April.

118. Świeżyński K. 1950. A simplified serological test for the determination of virus X in potato plants. Acta Soc. Bot. Pol. Vol. 20, nr. 2, 513.

119. Takahashi W. N., Rawlins T. E. 1933. Rod — shaped particles in tobacco mosaic demonstrated by stream double refraction. Science 77, 26.

120. Takahashi W. N., Rawlins T. E. 1946. An Electron Microscope study of two strains of potato virus X. Amer. J. Bot. Vol. 33, No 9.

120a. Van der Veken J. A. 1955. Isolation and preservation of a fraction containing antibodies against plant viruses from the mixture obtained after absorption of antisera by healthy plant extracts. Proc. of. sec. conf. Pot. Virus Dis. Wageningen 1955.

120b. Van Slogteren H. M. 1955. Serological micro-reactions with plant viruses under Paraffin Oil. Proceed. of sec. conference Pot. vir. dis. Wageningen.

121. Waggener P. E. 1952. Influence of hot temperature and pathogen variability upon spread of *Phytophtora infestans*. Iowa St. Coll. J. Sci. 26, 312.

122. Wahlem F. T. 1936. Methoden der Gesundheitsprüfung und Staudenauslese bei Kartoffeln. Rutii Zollikaten Schweiz.

123. Watson M. A., Roberts F. M. 1940. Evidence against the hypothesis that certain plant viruses are transmitted mechanically by aphids. Ann. Appl. Biol. 27, 227.

123a. Wartenberg H. 1938. Die Grundlagen der Methoden zur Pflanzengutwertbestimmung an Kartoffelknollen. Mitteil. Biol. Reichsanst. 58, 5.

123b. Wartenberg H. Hey A. 1936. Das Redoxpotential des Gewebebreis der Kartoffelknolle. Planta 25, 258.

124. Whitehead T., McIntosh T. P., Findlay W. M. 1945. The potato in health and disease. Edinburgh.

125. Youden W. J., Helen Purdy Beale 1934. A statistical study of the local lesion method for estimating Tobacco Mosaic Virus. Contr. Boyce Thomp. Inst. Vol. 6. No 3, 437.

126. Zaleski K. 1939. Badania i metody zwalczania chorób wirusowych ziemniaka w Niemczech i Holandii. Przegląd Dośw. Roln. T. II. Nr 7. Warszawa.

127. Zaleski K. 1953. Doświadczenie nad metodą wskaźnikową bulw ziemniaczanych (Tuber index method) w latach 1947 i 1948. Roczniki Nauk Rolniczych. Tom. 66-A-2 s. 141.

А. Козловска

КАРТОФЕЛЬНЫЕ ВИРУС X И ВИРУС Y

Резюмé

Заданием, поставленным себе автором труда, является представить степень изучения в настоящее время картофельных вирусов X и Y, вызывающих часто встречаемые в европейских картофельных культурах заболевания.

В первом разделе дана общая характеристика вируса X:

1. Способность его создавать штаммы, вызывающие разнообразные наружные симптомы так у растения хозяина как и у тестовых растений.

2. Влияние внешних условий на изменение количества вирусового белка в живой ткани и переход одних штаммов в другие.

3. Концентрация вирусового белка в отдельных органах растения, в особенности неравномерное распределение вируса X в пораженном клубне.

4. Загадочность процесса распространения вируса X в природе.

5. Получение белка вируса X в кристаллической форме: полученные в электронном микроскопе образы вируса X в капле свежего сока и образы кристаллических агрегатов, образующихся при выделении белковых веществ.

В разделе втором заключается:

1. Общая характеристика вируса Y, а также симптомов, сопутствующих болезни и концентрации белка вируса Y в отдельных тканях.

2. Разный способ реагирования на инвазию вируса Y различных сортов картофеля; сверхчуствительность, ведущая к устойчивости в полевых условиях.

3. Переход вируса Y в скрытую форму под влиянием внешних условий. Явление это было особенно отчетливо выражено в исследованиях автора, проведенных в высокогорных климатических условиях в особо засушливые и солнечные года.

4. Разницы во внешних симптомах реагирования штаммов вируса Y и вируса X на растение хозяина и тестовые растения.

5. Явление интерференции в пределах штаммов вируса X и вируса Y.

6. Роль насекомых в распространении в природе вируса Y. Краткость периода, в течение которого вирус Y сохраняет в теле насекомого инфекционные способности, приводит к тому, что решающими о распространении инфекции моментами являются крылатые насекомые и условия оптимально способствующие их полетам. Несмотря, однако, на решающую роль крылатых насекомых, переносящих вирусов Y, не всегда существует тесная зависимость между количест-

вом насекомых заразителей и между появлением полосатости на картофельных полях.

В разделе третьем, преимущественно на основании трудов Л. Гарбовского и К. Залеского, выяснено значение клубне-индексового метода в распознании вирусовых заболеваний картофеля в полевых условиях. Ввиду неодинакового распределения вирусового белка в отдельных глазках клубня следует употреблять для индексовых посадок целые четвертки содержащие по несколько глазков.

В части труда, обсуждающей признаки наличия вирусов X и Y в картофеле, даны, на основе трудов разных авторов, описания отдельных штаммов вируса X, а также указана классификация этих штаммов, как ее представляли себе Bawden, Salaman u Köhler.

На основе семилетних исследований описаны симптомы вызванного вирусами X и Y заболевания картофеля, культированного в Кракове и Закопанэм с 1948 года. Выделены 4 штамма вируса X, разнящиеся между собой степенью вирулентности. Так как наблюдаемые симптомы, вызванные вирусом X были аналогичны с описанными Salaman'ом, поэтому и классификация выделенных штаммов была произведена согласно с номенклатурой этого последнего. Чаще всего выступающими симптомами наличия вируса Y являлись полосатость, морщинистая мозаика, реже пятнистая полосатость.

При обсуждении метода биологических тестов было обращено внимание на то, сколь существенным является применение этого метода в особенности в случаях появления комплексной инфекции вируса X+Y. Учтены также в работе итоги внесения сока ботвы и ростков на тестовые растения: *Nicotiana tabacum* и *Datura stramonium*. Установлена на основании наблюдаемых признаков, методом преципитации, скорость распространения вируса X в ткани тестового растения.

Указан тоже, со ссылкой на труды разных авторов, способ проведения инокуляции.

У пораженных вирусом X сеянцев появляется в лучах UV характерное явление свечения, вызываемого скополетином. Метод этот дает, во-первых, возможность обнаруживания в листьях вирусового белка еще до появления видимых невооруженным глазом симптомов заболевания; во-вторых, позволяет выявлять вирус X даже в его безсимптомной форме и, в третьих, — легче различать штаммы вируса X и выявлять наличие вируса Y.

Так как нагроможденный в более значительном количестве никотин также флуоресцирует в лучах U. V,. наблюдения симптомов вируса X при их свете можно производить исключительно на молодых листьях табака, выращенных на стерилизованной почве.

Подробно представлены в труде также серологические методы выявления вируса X в картофеле. Главным делом является изготовление белковых экстрактов и больных растений, нужных для получения затем диагноститеских сывороток.

Экспериментально установлено, что для экстракции равно нормального, как и вирусового белка более всего пригодны молодые листья табака культированного в оранжерее.

При экстракции вирусового белка имеет значение не только возраст листьев, но и болезненные явления характеризующие сильно вирулентные штаммы вируса X. Так как вирус X, образуя при выделении агрегаты, легко денатурируется — не применялись при его экстракции ни замораживание листьев перед выжиманием из них сока, ни высаливание серно-кислым аммонием т. е. не применялся диализ. Хлорофил был выделяем путем подогревания сока в течение 10 минут в температуре 55°—56°C после чего белка выделялись при помощи трихлоруксусной кислоты. После удаления этим способом белка из больных листьев, оставшиеся еще в соку изостабильные белки выделялись посредством NaCl. Таким образом были получены два рода белковых экстрактов, а именно I фракция выделенная трихлоруксусной кислотой и II фракция высоленная поварной солью. Из этих фракций получались два рода сывороток, дававших в реакции преципитаций одинаковые результаты и, наоборот, выявлявшие в реакции связывания комплемента существенные между ними разницы.

Фракция II, содержащая гораздо меньше антител, присущих нормальному растительному белку, не даст в реакции связывания комплемента несвойственных торможений. Для выявления вируса X в тканях картофельной ботвы и ростков применяется обычно метод преципитации.

В исследованиях автора преципитация картофельных соков, исследуемых с сывороткой антивируса X была проведена капле-микроскопическим методом. Метод этот сравнительно прост и в то же время очень чувствителен. Выжатый из картофельных листьев сок центрифугируется в течение 10 минут при 3000 об./мин. Две капли сока помещаются на двух стеклышках. К одной капле добавляется капля неразбавленнной сыворотки. Сковозь бинокулярную лупу или в микроскопе с небольшим увеличением становятся заметны на темном фоне, в отраженном свете признаки наличия вируса X, в виде совокуплений, имеющих форму сильнее или слабее зарисованных клочьев, которых нет в контроле. Для определения титра преципитации исследуемый сок разбавляется до того момента, пока преципитация не прекратится после прибавки известной разбавленной капли.

Употребляемый обычно в медицинской диагностике метод сдвига комплемента выявляет по крайней мере десятикратно большую, по сравнению с преципитацией, чувствительность. В исследованиях автора по обнаружению вируса X степень чувствительности была около 60 раз выше, чем при применении преципитации. Вследствие такой высокой чувствительности одной из самых больших трудностей применения метода сдвига комплемента в отношении растительных вытяжек — является избежание несвойственного торможения гемолиза, вызванного наличием в диагностической сыворотке антител против нормальным протеинам, содержащихся в растительных соках. В исследованиях автора, в случае невыделения сыворотки соком здоровых растений, добавлялась к приготовленным для исследований растительным вытяжкам сыворотка против здорового белка ($0{,}1^{cc}$ на 5^{cc} вытяжки). После отцентрифугирования осадка вытяжки подвергались непосредственному исследованию и не дали несвойственного торможения с сывороткой антивирус X, полученной из фракции I растительных вытяжек. Применение сыворотки, полученной из фракции II, не требовало выделения растительных соков при помощи контрольной сыворотки.

Метод сдвига комплемента имеет значение прежде всего в случае широкого распространения безсимптомных штаммов вируса X. Имеющий здоровый вид картофель дает положительную преципитацию с сывороткой антивирус X, поскольку его сок, привитый на сеянцы табака, вызывает на таковых болезненные признаки.

В приведенных автором опытах сок картофельных ростков, перенесенный на табак, часто не вызывает на нем никаких признаков болезни. Полученный с такого табака сок, не давал преципитации вызывал зато иногда торможение гемолиза с сывороткой антивирус X в реакции связывания комплемента (табель стр. 65). В противоположность картофелю, из которого был взят сок для заражения, в листьях табака наступает рост вирусового белка и, когда в картофельных ростках нельза было установить наличия вируса X даже посредством сдвига комплемента, в табачных листьях его можно было выявить при помощи этого метода (табель стр. 64).

Применяя означенный метод сдвига комплемента при исследовании ростков ботвы картофеля, как и табачных листьев, на которых был перенесенный сок, можно самым убедительным образом наблюдать наличие и рост вирусового белка в растении в наступающих последовательно вегетационных периодах.

В восполнение применяемого в настоящее время метода выявления вирусов X и Y, описаны в последнем восьмом разделе методы оптические спектрофотометрические и поляризованного света.

Спектрофотометрический метод состоит в исследовании абсорбционного спектра растительных соков в ультрафиолетовом свете.

Метод этот дает возможность определения количества вирусового белка без уяснения характера заболевания.

В поляризованном свете эмульсия будущих в токе удлиненных особей вируса X вызывает явление двойного преломления выражающегося свечением. При получении экстрактов вируса X из зеленых листьев означенный метод употребляется для установления не подвергся ли вирус во время чистки денатурации.

A. Kozłowska

THE POTATO VIRUS X AND VIRUS Y. DIAGNOSTIC METHODS

Summary

The subject of this study is to present the diagnostic methods on the potato virus X and Y causing most frequent virus diseases in potato cultivations.

The first chapter is devoted to a general characterization of virus X: 1) The capability of forming strains causing different external symptoms both in the host plants and in the test plants. 2) The influence of external conditions on quantitative changes of the virus protein in living tissue, and on mutation of one strain into other. 3) The concentration of virus protein in certain organs of the plant with special emphasis on the irregular distribution of virus X within the diseased potato tuber. 4) The spread of potato virus X in the field. 5) Virus X protein in crystalline form: pictures obtained with the use of an electron microscope of both virus X in a drop of fresh juice, as also of crystal aggregates formed during protein substances precipitation.

Chapter II includes: 1) A general characteristic of virus Y symptoms and path of travel in the host plant. 2) Virus Y in relation to potato varieties, hypersensitiveness causing field resistance. 3) The modification of virus Y under the influence of external conditions specially mountains climate. 4) The differences in the reaction of strains of virus Y and virus X on the host plants and on test plants. 5) The phenomenon of interference within strains of virus X and virus Y. 6) The spread of virus Y in the field. The decisive role of winged insects in the transmission of virus Y. In our experiments there not always existed an interrelation between the number of infecting insects and the occurrence of virus Y symptoms in potato fields.

Chapter III presents the significance of the tuber index method for detecting potato virus diseases in potato fields. Due to the nonuniform distribution of virus protein in potato tuber, it is recommended to use whole tuber quarters with several eyes for indicative planting.

On the basis of investigations performed in Krakow and Zakopane since 1948 year we have recognised 4 strains of potato virus X varying in virulence, similar to those described by Salaman, namely: X^H, X^G, X^L and X^S.

The commonest symptoms caused by virus Y in South Poland are in the year of infection: necrotic streaks developed on veins of the undersides of leaves and top-necrosis. In subsequent years plants are stunted, leaves mottled and crinkled. Often mosaic mottling with fine streaks on veins occurs. In the mountains during especially dry and sunny years different potato varieties carry virus Y without symptoms. In those cases biological test was used. Tobacco and *Datura stramonium* seedling were inoculated with the juice of sprouts and leaves of investigated potatoes.

The biological test method was specially useful in frequent cases of mixed virus diseases caused by infection with potato virus X and potato virus Y. In case of virus Y characteristic vein clearing in tobacco leaves appeared.

The rate of invasion by virus X of test plants tissues, specially *Nicotiana tabacum* leaves, was determined on the basis of symptoms and by means of the precipitation tests. (Tabl. I. p. 38).

The strains of potato virus X were investigated on test plants in ultra-violet light. Tobacco seedlings few days after inoculation with virus X show in the ultra-violet light phenomenon of fluorescence of scopoletin. This method enables: 1) earlier detection of virus protein in leaves before visible symptoms can be observed with the naked eye, 2) detection of virus X in its non-visible form in tobacco plants, 3) distinguishing of virus X strains, and 4) determining the presence of virus Y.

On tobacco leaves infected with masked virus X, strains H, serologically confirmed, fluorescence appears in U. V. light in a varied intensity. Sometimes the veins are shining quite distinctly in their whole length or only partly.

As greater amounts of nicotine show fluorescence in UV light, observations on virus X symptoms can be carried out only on immatured leaves on tobacco plants grown in sterilized earth.

Serological testing methods concerning potato virus X are widely discussed in this work. For preparation of antisera against potato virus X the method of purification extracts from healthy and diseased plants is indispensable.

It has been experimentally proved that young immature tobacco leaves grown in greenhouses are best for extracting both normal and virus protein. For extracting virus X protein the immature tobacco

leaves showing symptoms of highly virulent strains of virus X are to be used.

As the purification procedures caused the virus X particles to aggregate linearly and reduced its infectivity, neither freezing of leaves before grinding and pressing, nor salting out with ammonium sulphate, nor dialysis were applied. The first step to clarify the sap obtained from macerated leaf laminae was precipitation of chlorophyll by centrifuging the juice after heating ata temperature of 55°—56° for 10 minutes. To purified infective sap trichloroacetic acid was added. The resulting precipitate was removed by centrifugation, extracted with dilute NaOH to pH 7 and used as I fraction for preparation of antisera.

The supernatant fluid, remaining after separation of proteins by trichloroacetic acid, still contained iso-stable proteins, which were precipitated by NaCl within 24 hours. This II fraction used for a precipitation test gave same results, as fraction I, but used for complement fixation test, when very small amounts of virus were to be demonstrated, the results were different. Namely antiserum obtained of fraction II, deprived of normal protein antibodies was more specific and did not cause inhibition of lysis of the blood cells with normal vegetable protein. Fraction I gave in the same conditions a positive reaction both with infective and normal tobacco and potato sap.

The serological methods in the plant virus investigations are universally used. In our investigations the slide agglutination and precipitation test has been used for virus X diagnostics. The microscopic drop method is simple to perform and shows a high degree of sensitiveness.

The juice obtained from leaves is centrifugated for 10 minutes at 3000 r/m. Two drops of juice are placed on two sildes; to the first a drop of undiluted anti-virus X serum is added, to the second one drop of control serum. The presence of virus X can be microscopically detected (a dark field and diffused light should be used) in the form of more or less visible flakes, which are not present in the control. The strength of precipitation is determined by means of diluting the juice until one added diluted drop checks precipitation.

The complement fixation test used universally in medical diagnostics shows at least a 10 times greater sensitiveness than the precipitation test. In our investigations the sensitiveness of this method was 60 times greater. Due to this high degree of sensitiveness, one of the greatest difficulties in using the complement fixation test consists of avoiding non-specific hemolysis inhibition, caused by the presence in diagnostic serum of antibodies reacting against normal protein present in vegetable juices. In our investigations an anti-healthy protein serum was added to the plant extractions under investigation (0,1 cc

per 5 cc of extract). After centrifugating the supernatant fluid was subjected to direct examination.

When we used the serum obtained from fraction II it was not necessary to precipitate plant juices with control serum.

The complement fixation test is especially useful for detecting virus X strains showing no external symptoms on tobacco. Healthy looking potatoes give a positive precipitation reaction with anti-virus X serum if their juice evokes disease symptoms on tabacco seedlings. Many performed in Cracow experiments showed that potato sprouts inoculated on tobacco plants did not evoke any disease symptoms on the latter. However the juice obtained from such tobacco plants sometimes caused hemolysis inhibition with anti-virus X serum in complement fixatien test, without giving precipitation reaction. An increase of virus protein in tobacco leaves takes place even then, when virus X could not be detected in potato sprouts by means of the complement fixation test. By applying complement fixation test both for potato sprouts and stalks, as also for inoculated tobacco leaves, we have observed the presence and increase of virus protein in plants during successive periods of vegetation.

Chapter VIII describes the spectrophotometric optical and the polarized light method for virus diagnostics. The former consists of investigating the absorption spectrum of vegetable juices under UV light. This method enables quantitative determination of virus protein in tissues, and identification of the disease. A suspension of elongated virus X units in polarized light evokes double refraction of flow, evident as intense sheen. This method is usefu for determining whether virus X did not denature during purification.

TREŚĆ

WSTĘP 5

1. ZIEMNIACZANY WIRUS X 6
A. Szczepy wirusa X i ich zależności od warunków zewnętrznych . . . 6
B. Rozszerzanie się wirusa X w przyrodzie 8
C. Natura białka wirusa X, badania poza rośliną „in vitro" 10
D. Ziemniaczany wirus S 13

2. WIRUS SMUGOWATOŚCI Y. 14
A. Natura białka wirusa Y, przebieg chorobowy 14
B. Szczepy wirusa Y, ... 20
C. Rozszerzanie się wirusa Y w przyrodzie, rola owadów 21

3. WYKRYWANIE CHORÓB WIRUSOWYCH ZIEMNIAKÓW METODĄ WSKAŹNIKOWĄ BULW („TUBER INDEX METHOD"). . . . 24

4. OBJAWY WIRUSA X i WIRUSA Y NA ZIEMNIAKACH 27

5. METODA BIOLOGICZNYCH TESTÓW 32

6. BADANIE SIEWEK TYTONIU PORAŻONYCH WIRUSEM X i WIRUSEM Y W ŚWIETLE UV 40

7. METODY SEROLOGICZNE BADANIA WIRUSA X W ZIEMNIAKACH 45
A. Otrzymywanie ekstraktów białkowych ze zdrowych roślin tytoniu . . 45
B. Otrzymywanie białka wirusowego z porażonych wirusem X liści tytoniu 47
C. Otrzymywanie swoistych surowic 53
D. Precypitacja 55
E. Wiązania dopełniacza 59
F. Znaczenie reakcji wiązania dopełniacza dla wykrywania utajonych szczepów wirusa X 62

8. METODY OPTYCZNE. 66
A. Badanie przy użyciu spektrofotometru 66
B. Badanie w świetle spolaryzowanym 67

LITERATURA. 68
Картофельные вирус X и вирус Y 74
The Potato Virus X and Virus Y. Diagnostic Methods 78

WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW I REDAKCJI DZIAŁOWYCH INSTYTUTÓW

1. W Rocznikach Nauk Rolniczych ogłasza się drukiem tylko samodzielne prace naukowe.
2. Poszczególne prace winny się mieścić w ramach 6—24 stron druku, w wyjątkowych wypadkach objętość pracy może być większa.
3. Maszynopisy pisane jednostronnie z interlinią i marginesem (4 cm z lewej strony) po 29 wierszy na stronie, należy dostarczyć do Redakcji Naczelnej w 3 egzemplarzach.
4. Do każdej pracy należy dołączyć dwie recenzje merytoryczne.
5. Po teście pracy winny być zamieszczone krótkie streszczenia (do ¾ str. druku) w języku rosyjskim i angielskim, zawierające również pełny tytuł pracy w tłumaczeniu. Na końcu podaje się ponumerowany spis bibliograficzny ułożony alfabetycznie w następujący sposób: nazwisko i pierwsze litery imienia autora, tytuł, miejsce i rok wydania dla książek, dla czasopism ponadto tytuł czasopisma w przyjętym skrócie, Nr tomu, Nr zeszytu str. i rok w nawiasie. Odsyłacze w teście muszą odpowiadać numeracji spisu bibliograficznego.
6. Rysunki i wykresy w wyraźnej formie graficznej, ponumerowane i zaopatrzone odpowiednimi nagłówkami, powinny być załączone do maszynopisu, a nie wklejone pomiędzy tekstem. Nie należy podawać surowego materiału statycznego, tylko zestawienia zbiorcze, wynikowe.
   Wykresy nie powinny dublować zestawień cyfrowych, ujętych w tabele, Całość materiału ilustrującego należy ograniczyć do niezbędnego minimum.
7. Autorzy nie mogą dokonywać zasadniczych zmian w złożonym już tekście, poprawki nie powinny już powodować zmiany ilości wierszy na stronie. Autor otrzywuje bezpłatnie 50 odbitek.
8. Od roku 1953 Roczniki Nauk Rolniczych wychodzą w następujących seriach tematycznych:

   A — Roślinna
   B — Zootechniczna
   C — Mechanizacji
   D — Monografie
   E — Weterynarii
   F — Melioracji i Użytków Zielonych.

   Serie A, B, C, E i F wychodzą w zeszytach numerowanych od 1—4, przy czym każde cztery zeszyty stanowią kolejny tom (np. tom 66 Seria A, zeszyt 1, 2, 3, 4; tom 67 Seria A, zszyt 1, 2, 3 i 4). Seria F rozpoczyna się od tomu 71. Seria D Monografie — wychodzi w kolejnych tomach.
9. Roczniki można nabywać w księgarniach naukowych Domu Książki. Cena pojedynczego zeszytu 12 zł. Prenumeratę przyjmuje wyłącznie Księgarnia Rolnicza Domu Książki — Warszawa, Al. Jerozolimskie 105.